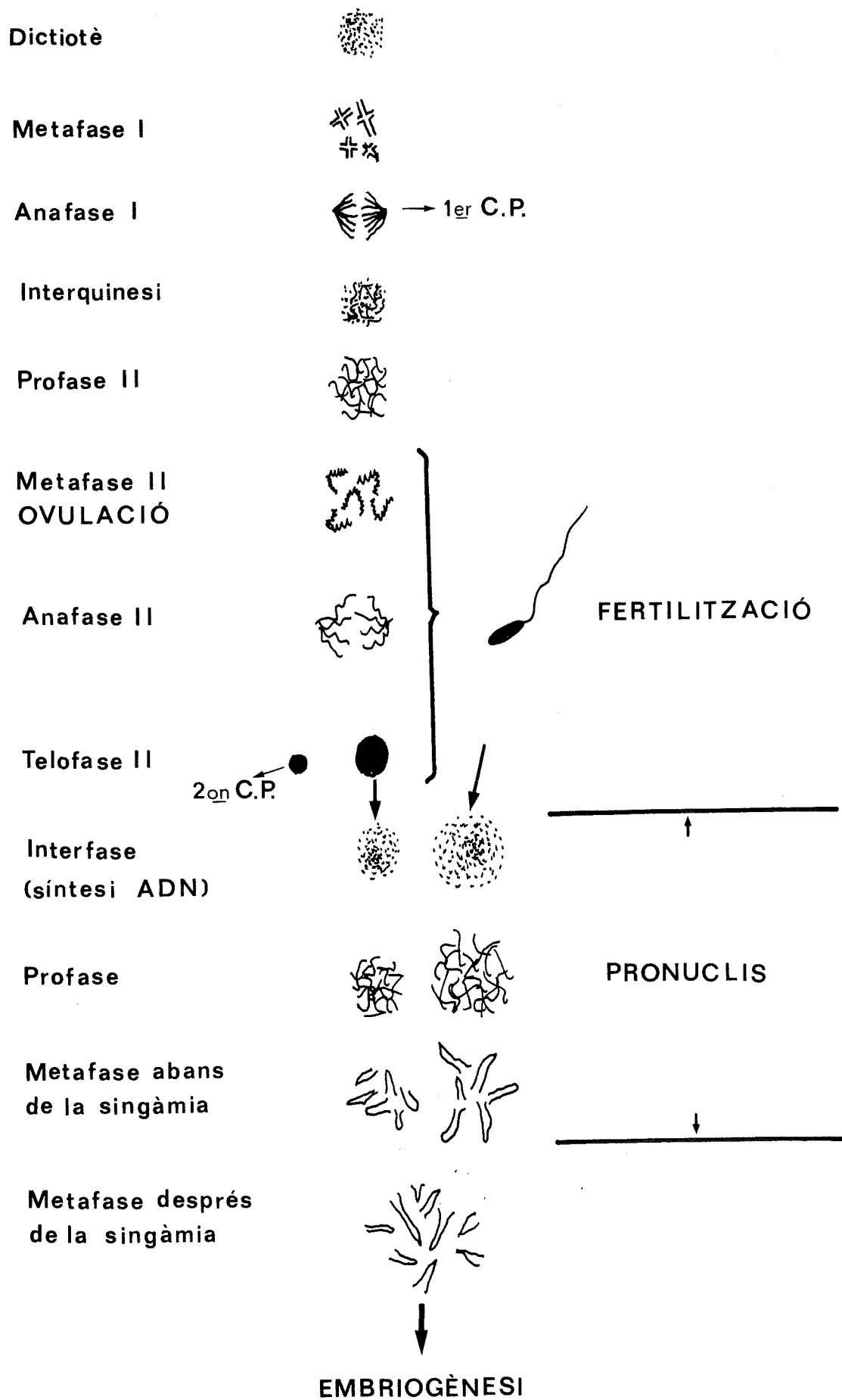


Fig. 23.- Esquema de l'aspecte que ofereix el nucli de l'oòcit durant la represa de la meiosi i el del zigot després de la fecundació.



Per tant, al cap d'onze hores del HCG l'òcit està entre la telofase I i la prometafase II (estadi de massa de cromatina); al cap de dotze hores es troba a la prometafase II i al cap de les dotze o tretze hores arriba a la metafase II, on s'atura.

Quan s'injecten ratolins adults amb gonadotrofines molts oòcits abandonen l'ovari abans que la maduració meiòtica sigui acabada (abans d'arribar a la metafase II) completant-se a l'oviducte.

Les dosis de superovulació de PMSG i HCG poden induir canvis pre-ovulatoris a qualsevol fol·licle en estadi més enllà del tipus 5b, però només els de tipus 8 tindran oòcits en la metafase II. Segons Pedersen (1972) el nombre de fol·licles en creixement en el ratolí és màxim a l'última meitat del període d'immaduresa, a l'edat de 21 a 28 dies, el què s'anomena el pic pre-puberal. No és d'estranyar, perquè durant les dues primeres setmanes de vida comencen a créixer més fol·licles que mai, els quals esdevindran fol·licles grans al cap de catorze dies. Després comença a minvar el seu nombre i al cap de trenta-cinc dies aquest ja ha disminuït considerablement.

2.1.4. Font d'espermatozoides

Hi ha tres categories "clàssiques" d'espermatozoides:

- Epididimals
- Ejaculats
- Uterins

L'elecció d'una d'elles depèn de l'espècie animal amb la qual es treballi i de les necessitats de l'investigador imposades pel disseny experimental que es segueixi.

EPIDIDIMALS

Són els espermatozoides extrets de l'epidídim caudal i conductes deferents en els que ja són madurs i mòbils.

Aquest mètode és el més utilitzat per als animals petits (fonamentalment

d'experimentació). En la tècnica que s'usa normalment l'epidídim caudal es retira de l'animal i se n'extreuen els espermatozoides pressionant suaument per a fer-los sortir al medi. Així s'obté una quantitat important d'espermatozoides amb una bona capacitat fecundant.

Una alternativa utilitzada en animals més grans que el ratolí és la per fusió retrògrada dels epidídims des del conducte deferent, la qual cosa proporciona una suspensió molt neta d'espermatozoides (Brackett i col. 1978).

EJACULATS

Són els obtinguts d'una mostra de semen presa per medis manuals (electroejaculació, masturbació) o amb vagines artificials. És el mètode fre qüentment emprat en animals grans.

Quant a la quantitat dels espermatozoides obtinguts de l'ejaculat compa rat amb els epididimals sembla clar que els canvis que tenen lloc en la superfície cel.lular durant l'ejaculació (veure 1.1.1.2.) els afecten la fertilitat, de manera que s'han de fer rentats que a vegades posen en perill la pròpia supervivència dels espermatozoides.

Així, segons Tsunoda i Chang (1975a) la penetració a diferents temps d'incubació dels de l'epidídim i dels ejaculats en el ratolí són els següents:

Temps d'incubació (hores)	Espermatozoides ejaculats (%)	Espermatozoides epididimals (%)
0.5	0	28
1	6	42
2	26	81
2.5	41	83

Sembla, doncs, que la capacitació s'assoleix abans i millor amb els espermatozoides epididimals que no pas amb els ejaculats.

UTERINS

Són els espermatozoides recollits en el tracte genital femení un temps després de la inseminació. Teòricament són els més idonis per a la fecundació perquè ja estan capacitats, però el problema és obtenir-ne una quantitat suficient i també haver d'utilitzar una femella que no sigui la donadora d'òcits per descartar la possibilitat d'una fecundació in vivo. Aquesta femella no cal que sigui de la mateixa espècie, pot ser d'una altra introduint-li els espermatozoides per inseminació artificial.

Aquest tipus d'espermatozoides era molt utilitzat abans que s'arribés a aconseguir la capacítació in vitro, però actualment s'utilitza només en els casos en els que aquesta no s'assoleix, ja que es prefereix que tot el procés sigui in vitro (Chang i col., 1971).

2.1.5. Factors que afecten la fertilització in vitro

Els factors que afecten la FIV deriven de les condicions en què es realitza la fecundació. En general, qualsevol paràmetre que variï d'experiment a experiment pot canviar, a vegades de forma quasi imperceptible, el resultat obtingut. És per això que l'estandardització de les circumstàncies en què es desenvolupa l'estudi és tan important. Cal tenir en compte aquests factors a l'hora de fer comparacions amb altres autors que utilitzen metodologies diferents.

L'efecte d'aquestes condicions no sols es tradueix en variacions en la freqüència de fertilització sinó també en les característiques genètiques dels embrions obtinguts.

El conjunt de factors que afecten la FIV ha estat agrupat en quatre categories diferents:

- Condicció dels gàmetes
- Condicions de pre-incubacions
- Condicions d'inseminació
- Condicions d'incubació

2.1.5.1. Condició dels gàmetes

ENVELLIMENT DELS GÀMETES

L'envelliment fisiològic dels gàmetes en les vies genitals produeix efectes importants tant en llur capacitat fecundant com en les característiques genètiques dels embrions obtinguts.

La mitjana de la vida funcional dels gàmetes de ratolí in vivo és la següent (Anderson, 1969):

Manteniment de la fertilitat:

mascle, de sis a dotze hores

femella, de sis a quinze hores

Manteniment de la motilitat dels espermatozoides: treze hores

Pel que fa a la femella l'envelliment produeix canvis importants en la formació del fus meiótic, que gira i s'acosta cap el centre de l'òcit, provocant l'aparició d'errors en l'extrusió del segon corpuscle polar juntament amb efectes sobre el desenvolupament del pro-nucli femení. D'altra banda, es produeix una migració centrípeta dels grànuls corticals que s'ha interpretat com la responsable dels errors en el bloqueig de la polispèrmia (Szöllosi, 1975). En algunes espècies (conill, rata) aquesta migració no es detecta però aleshores els grànuls corticals són incapaços de fusionar-se amb la membrana de l'òcit de manera que la freqüència de polispèrmies també augmenta.

De l'envelliment in vitro en resulta un increment del nombre d'òcits que s'activen partenogenèticament i que donen embrions haploides inviables, passant d'un 2.2% al moment del control a un 59.3% al cap de 14 hores de l'ovulació (Zackowski i Martin-DeLeon, 1984).

Alguns autors (Fraser, 1979a) han descrit el fet que hi ha una major fertilització dels òcits al cap de tres hores d'ésser ovulats que no pas en els acabats d'ovular. Aquest fet s'ha interpretat com la necessitat d'una certa maduració dels gàmetes, fonamentalment de la massa del cumulus oophorus, abans que els espermatozoides puguin interaccionar eficaçment amb ell. Caldria distingir, doncs, entre un temps de maduració (3 hores) i un temps molt més llarg (14 hores) d'envelliment.

Per altra banda els espermatozoides de ratolí no han pogut ésser enve-
llits un cop ejaculats a causa del poc temps durant el qual mantenen la
seva supervivència. En canvi sí que s'han fet estudis d'envelliment en
el mateix tracte genital masculí (Martin Deleon i Boice, 1982; Boice i
Martin-Deleon, 1984) resultant un increment de les anomalies cromosòmi-
ques, fonamentalment de les hiperploïdies.

A la pràctica la utilització de gàmetes recentment obtinguts elimina
tot aquest seguit d'inconvenients derivats de l'envelliment.

FONT D'ESPERMATOZOIDES

Es refereix a si són ejaculats o epididimals. Aquesta distinció serà im-
portant per a determinar el temps, les condicions i el tipus de rentat
(centrifugació per als ejaculats, dilució per als epididimals) per asso-
lir la capacitat.

CONDICIÓ DELS OÒCITS

Les cobertes oocitàries juguen un paper primordial en els processos de
la fecundació i la seva presència o absència té una importància cabdal.

Les cèl.lules del cumulus mantenen una estreta relació amb l'oòcit de
manera que poden suplir certes mancances de l'ambient de cultiu (per
exemple, s'ha demostrat que poden produir piruvat in vitro (Imai i col.,
1982)). En general les FIV es fan en presència del cumulus perquè sem-
bla que faciliten la capacitat, fonamentalment si van acompanyades
de fluïds de l'oviducte (Rogers, 1978). A més tenen un efecte beneficiós
a baixes concentracions d'espermatozoides, ja sigui promovent la capaci-
tació, la R.A. o afavorint l'adequada relació de l'espermatozoide amb
l'oòcit (Stanger i Quinn, 1982).

Quant a l'efecte de la zona pel·lúcida sobre la capacitat fecundant dels
espermatozoides sembla no afectar-la d'una manera directa. La zona pre-
senta llocs de reconeixement espècie-específics que la converteixen en
una barrera contra espermatozoides d'altres espècies i al mateix temps
participa dels mecanismes de bloqueig de la polispèrmia (veure 1.1.2.1.
C.).

Els oòcits sense zona pel·lúcida de certes espècies (hàmsster) admeten la penetració d'espermatozoides d'altres espècies, permetent-los àdhuc la descondensació del nucli i la formació de cromosomes metafàsics (Rudak, 1981; Martin, 1983) la qual cosa s'ha emprat com a detector d'anomalies genètiques i de la capacitat fecundant de mostres de semen humanes.

D'altra banda quan es fa una FIV intraspecífica amb oòcits sense zona s'ha detectat un augment espectacular (80%) en el nombre d'embrions poliploides obtinguts a causa de la manca de bloqueig efectiu de la polispermia (Witkowska, 1981).

CARACTERÍSTIQUES GENÈTIQUES DELS ANIMALS

S'ha descrit en el ratolí la influència de factors genètics en el temps i la seva eficiència de fertilització, en la incidència de la polispermia i de l'aneuploidia i en la freqüència de divisió (Niwa, 1980). Malgrat que les característiques genètiques d'ambdós gàmetes tinguin un efecte sobre la fertilització sembla que el genoma del mascle té una major influència.

En general es considera que els híbrids (F_1) de dues soques endogàmiques i les soques creuades a l'atzar presenten una major eficiència de FIV que no pas les soques endogàmiques entre si o amb si mateixes (Kaleta, 1977).

Fraser (1977) ha descrit tres patrons de capacitació depenent del tipus d'animal emprat com a dador d'espermatozoides:

- . Creuats a l'atzar (T_0) presenten un període de pre-incubació curt, que permet la dispersió i al final del qual assoleixen un màxim de motilitat, que és suficient com per a assegurar una penetració ràpida i una eficiència elevada de fertilització.

- . Els híbrids (F_1) tindrien un període curt de pre-incubació suficient com per a donar una eficiència de fertilització elevada, però la velocitat de penetració seria considerablement inferior a la del grup anterior.

. Les soques endogàmiques tindrien una fertilització reduïda i retardada quan es produís la dilució després d'un temps de pre-incubació curt.

Així mateix, algunes soques permeten el creixement dels zigots in vitro fins a blastòcit perquè no exhibeixen un bloqueig a l'estadi de dues cèl.lules com el que presenten els embrions de soques creuades a l'atzar (Ackerman i col., 1983).

L'aparició de la polispèrmia és un factor que varia molt en les diferents combinacions de soques estudiades. Aquestes variacions s'atribueixen a deficiències en els mecanismes de bloqueig de la polispèrmia a diferents nivells: la zona pel.lúcida, la membrana vitel.lina o la capacitat de resposta dels espermatozoides a aquests mecanismes (Kaleta, 1977).

Quant a la incidència d'aneuploïdies sembla clar que els F_1 tenen una freqüència d'aparició superior als altres tipus d'animals (Hansmann i Jenderny, 1983).

2.1.5.2. Condicions de pre-incubació

TEMPS

El temps de pre-incubació és el temps necessari perquè els espermatozoides es capacitin abans de realitzar la inseminació. Aquest temps varia i depèn de les soques i dels tipus d'espermatozoides emprats.

En general en el ratolí aquest temps oscil.la entre una i dues hores, encara que hi ha autors que prefereixen fer la inseminació immediatament després de l'obtenció dels espermatozoides sense esperar la pre-incubació. En aquest cas la capacitació té lloc en presència dels oòcits i es requereix un temps d'incubació més llarg per a poder suplir el temps de pre-incubació (Iwamatsu i Chang, 1970).

CONCENTRACIÓ D'ESPERMATOZOIDES DURANT LA PRE-INCUBACIÓ

Un factor important estretament relacionat amb el temps de pre-incubació és la concentració en la qual es troben els espermatozoides per assolir la capacitació. S'ha demostrat que pre-incubar espermatozoides de soques

endogàmiques en forma concentrada (de l'ordre de 10×10^7 esp./ml) dóna millors resultats que no pas fer-ho diluïda (aprox. 1×10^6 esp./ml). S'ha donat l'explicació (Fraser, 1977) que existiria un efecte de cooperació entre espermatozoides "normals" (és a dir, aquells que probablement seran capaços de capacitar-se totalment i fertilitzar els oòcits). La concentració d'aquests espermatozoides "normals" seria un factor determinant de la capacitació.

Com sigui que les soques endogàmiques presenten un major nombre d'espermatozoides anòmals, aquestes requeririen una més elevada concentració durant un període més llarg de pre-incubació (veure 2.1.5.1.).

2.1.5.3. Condicions d'inseminació

TIPUS D'INSEMINACIÓ

Hi ha dos tipus fonamentals d'inseminació que estan lligats d'alguna manera amb les condicions de pre-incubació. Aquests són:

- . Afegir els oòcits a una suspensió diluïda d'espermatozoides (pre-incubació diluïda).

- . Afegir els espermatozoides a un medi que contingui els oòcits (pre-incubació concentrada).

El primer tipus és el que s'empra més sovint, fonamentalment perquè amb ell disminueix la magnitud de l'anomenat "efecte de dilució" perjudicial per a l'obtenció d'un bon nivell de fertilització.

Aquest efecte es tradueix en una pèrdua de viabilitat observada quan una suspensió d'espermatozoides es dilueix dràsticament en un medi artificial. Podria ser que es produís per la reducció de la concentració de secrecions essencials del tracte genital masculí al voltant dels espermatozoides, ja que sembla pal.liar-se afegint al medi factors de "supervivència" purificats de l'epidídim caudal (Morton i col., 1979). En l'hàmsster s'han identificat aquests factors com a components proteics de baix pes molecular (<500D) i d'altres d'elevat pes molecular (>35000 D), alguns d'ells associats a l'albúmina sèrica.

Altres autors (Harrison i col., 1982) han postulat la possibilitat que vingués mediat per la pèrdua de motilitat i un augment de les propietats adhesives de la superfície dels espermatozoides que implicaria una major adherència de les cèl.lules entre si i amb els flascons que les contenen.

FLUÏDS NATURALS

Els fluïds procedents del tracte genital masculí i femení tenen efectes diferents sobre els processos fecundatius. En termes generals el fluïd fol·licular, l'oviductal, l'uterí i les cèl.lules del cumulus (tots ells d'origen femení) són considerats com a beneficiosos per a la fertilització, mentre que els seminals i epididimals semblen retardar-la o inhibir-la (Rogers, 1981).

Pel que fa a aquests darrers hi ha dades contradictòries en un i altre sentit. Mentre uns autors els consideren beneficiosos per a la capacitat (Gwatkin i col., 1974) d'altres els consideren com un agent decapacitant (Oliphant i Brackett, 1973) o bé inhibidor de la penetració (Iwamatsu i Chang, 1971). Un tercer grup considera que el fluïd epididimal no té cap efecte i que les interpretacions donades sobre la millora dels resultats a base d'extreure'l per rentat provindrien de l'eliminació de substàncies nocives lliurades per altres espermatozoides malmesos que també serien eliminades (Fraser i Drury, 1976).

En definitiva, les diferències observades s'expliquen com a variacions entre les diferents soques emprades a cada experiment i en les condicions en les quals s'han dut a terme.

ESTIMULADORS I INHIBIDORS ARTIFICIALS

Existeixen nombrosos factors "artificials" que estimulen o inhibeixen els processos que acompanyen la fertilització.

Entre els factors estimuladors hi figuren, entre d'altres, els següents:

- . Cafeïna (Fraser, 1979) i dibutiril AMPc (Fraser, 1981), que actuen sobre els nivells de AMPc incrementant la motilitat dels espermatozoides i llur capacitat fecundant.

. Hipotaurina i taurina (Leibfried, 1981), que junt amb una catecolamina (epinefrina) s'han identificat com els components del SMF (factor de motilitat espermàtica) i estimularia i mantindria la motilitat (hiperactivació) dels espermatozoides. Aquest factor estaria associat a les cèl.lules del cumulus i fluïds oviductals de forma natural, de manera que afegint els anàlegs al medi es mimetitzaria l'acció del factor in vivo (Bavister, 1980; Stanger, 1983) i que han permès efectuar FIV amb concentracions "fisiològiques" d'espermatozoides (veure apartat següent).

De factors inhibidors n'hi ha de moltes menes i amb molts efectes diferents. Entre els més estudiats es troben els inhibidors dels enzims acrosòmics (Perreault i col., 1980; Goodpasture i col., 1981; Beyler i Caneveld, 1982; Fraser, 1982) i els anticossos antispermatozoides i antizona pel.lúcida (Jílek i Pavlok, 1975; Tsunoda, 1977; Tsunoda i col., 1982; Sailing i O'Rand, 1982).

Aquests compostos són àmpliament estudiats per la seva possible aplicació al camp de la contracepció masculina en l'espècie humana.

CONCENTRACIÓ D'ESPERMATOZOIDES

Aquest factor ha estat un dels més estudiats i controvertits de tots els que afecten la FIV. Sembla clar que s'han detectat variacions entre diferents soques en els nivells òptims i mínims necessaris per a obtenir una bona FIV, variacions que cal tenir en compte al moment de comparar les dades obtingudes.

La fertilització in vivo té lloc a la majoria de mamífers amb una relació espermatozoides:òcit relativament baixa, de l'ordre de $1 \times 10^1 - 1 \times 10^2$: 1. Contràriament, els experiments in vitro requereixen concentracions de diversos ordres de magnitud superiors a les fisiològiques per a obtenir resultats acceptables.

Això pot ser perquè només una part dels espermatozoides presents a l'epidídim puguin esdevenir capaços de fertilitzar els oòcits, de manera que serien els que, d'alguna manera, seleccionaria el tracte genital femení o bé, el què sembla més probable, que sigui a causa de la ineficàcia de les condicions de cultiu actuals, principalment dels

medis de cultiu que suporten els processos que envolten la fertilització (Thadani, 1982). Aquesta idea l'abonen els bons resultats obtinguts (Leibfried, 1981; Stanger, 1983) suplementant els medis amb estimuladors de la motilitat pels espermatozoides als quals ja hem fet esment.

Tret d'aquests estudis, en general el nombre d'espermatozoides per oòcit és força elevat. Segons Tsunoda i Chang (1975b) es necessiten com a mínim més de 100 esp./oòc. per a obtenir una freqüència de penetració superior al 60%. Les concentracions òptimes més emprades en la FIV del ratolí varien segons un ampli ventall que va des de 0.3×10^5 fins a 9×10^6 esp./ml (Fraser i Drury, 1975).

Les concentracions més baixes donen una disminució de la fertilització per una reducció del nombre d'espermatozoides capaços de fecundar.

Les concentracions més altes es pensa tradicionalment que l'esgotament dels metabòlits del medi i/o l'acumulació de productes de rebuig produiria la disminució de la fecundació. Actualment hi ha dades que indiquen que seria la presència d'un inhibidor, probablement d'origen epididimal, que no afectaria els patrons de supervivència ni de motilitat, però que hauria d'ésser diluït suficientment com per a permetre una FIV efectiva (Stanger i Quinn, 1982).

La concentració d'espermatozoides té un altre efecte a més a més de l'esmentat: la influència en el nombre d'oòcits polipenetrats que es deriven de la FIV. Aquesta relació entre augment de la concentració i augment de la polispèrmia seria produïda per l'increment de la probabilitat de què dos espermatozoides penetressin la zona gairebé alhora i per pols oposats de l'oòcit, la qual cosa els permetria evitar els mecanismes de bloqueig de la polispèrmia que serien massa lents com per a impedir-ho (veure 1.1.2.1.C.) (Fraser i Maudlin, 1978).

2.1.5.4. Condicions d'incubació

VOLUM DE CULTIU

El volum de medi que contenen els gàmetes durant la fertilització pot tenir una certa importància. En general s'utilitzen volums d'incubació

del voltant de 0.4 ml de medi.

Els volums massa grans presenten efectes de dilució elevats, disminuint la supervivència dels espermatozoides i a més a més, fan difícil la lo calització dels embrions un cop fertilitzats.

Els volums massa petits esgoten fàcilment els nutrients i acumulen pro ductes de rebuig que poden ser nocius per els gàmetes.

Recentment Siddiquey i Cohen (1982) han proposat la idea que fos la freqüència de col.lisions-interaccions entre espermatozoides i oòcits el determinant del percentatge de fertilització obtingut, recomanant volums petits (20 μ l) amb un nombre elevat d'espermatozoides (1.2×10^4) per a obtenir bons resultats (80%) en la fertilització.

TEMPS DE CULTIU

Es refereix al temps durant el qual els gàmetes romanen junts al medi de fecundació.

En general és d'unes cinc a sis hores (en el ratolí), temps suficient com perquè s'hagi realitzat la fertilització de la majoria dels oòcits sense que s'acumulin materials de rebuig produïts per la mort de nombro^{sos} espermatozoides i per efecte de R.A. incontrolades que acostumen a tenir lloc en condicions in vitro.

Existeixen dissenys experimentals que allarguen aquest temps per elimi^{nar} la pre-incubació, de manera que la capacitació tingui lloc en pre^{sència} dels gàmetes femenins, però en aquests casos el temps de cultiu tampoc ultrapassa les vuit hores.

Un cop passat aquest temps els zigots es recullen i es posen a incubar en medi de creixement segons les necessitats de l'estudi a realitzar.

2.2. Metodologia experimental de la fertilització *in vivo* i *in vitro*

2.2.1. Material d'experimentació

2.2.1.1. Animals emprats

Els animals emprats com a donadors de gàmetes i embrions han estat ratolins de la F_1 resultants de l'encreuament de dues soques consanguínies, la C57B1/6J i la CBa/Ca (obtingudes de Jackson's a través d'Ifa-Credo (França) i Olac'76 (U.K.)), pertanyent indistintament els progenitors patern i matern a cadascuna de les dues soques.

S'han triat aquests animals per tres raons fonamentals:

- . Per provenir de soques genèticament definides i consanguínies que permeten una uniformitat genètica dels individus fent disminuir la variabilitat individual i donant una major uniformitat a la mostra.

- . Per ser soques àmpliament estudiades, amb la qual cosa es facilita la comparació amb altres autors.

- . Per donar una eficiència de fertilització *in vitro* elevada.

S'han emprat femelles de vint-i-quatre a vint-i-vuit dies d'edat per aprofitar el pic pre-puberal en la superovulació (veure 2.1.3.) i també mascles majors de dos mesos, per tal d'assegurar-ne la fertilitat (el període reproductiu dels mascles de ratolí comença al mes i mig d'edat, aproximadament).

2.2.1.2. Medis de cultiu-Preparació

Tan important com la composició del medi (veure 2.1.1.) és la seva preparació. Normalment es preparen solucions mare 10 o 100 vegades concentrades, les més estables de les quals es guarden durant un mes, estèrils, a + 4°C. Les més inestables, com ara les de bicarbonat i piruvat,

es renoven cada dues setmanes.

Tots els reactius emprats són Merck amb una puresa "per anàlisi", excepte la BSA del medi T₆ que és Sigma Fracció V i la del M₁₆ i M₂ que és Sigma cristal·litzada i liofilitzada.

Per preparar els medis s'utilitza exclusivament aigua tridestil·lada amb una resistència superior a 14 Mohm i en flascons i pipetes de plàstic rebutjable. No s'empra el material de vidre, ja que acostuma a portar incorporats contaminants dels detergents que a la llarga són tòxics per a les cèl·lules.

Les solucions preparades per a cadascun dels medis són:

MEDI T₆

Solució mare A' (x10 concentrada) (un mes, estèril, a +4°C)

	<u>g/100 ml</u>
NaCl	5.719
KCl	0.106
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.096
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.129
Lactat sòdic	2.106
Glucosa	1.000
Penicil·lina G sòdica	0.060
Estreptomicina sulfat	0.050

Solució mare B' (x10 concentrada) (dues setmanes a +4°C)

	<u>g/100 ml</u>
NaHCO ₃	2.101
Roig fenol	0.010

Solució mare C' (x100 concentrada) (dues setmanes a +4°C)

	<u>g/10 ml</u>
Piruvat sòdic	0.052

Solució mare D' (x100 concentrada) (un mes estèril, a +4°C)

	<u>g/10 ml</u>
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.262

Preparació:

solució mare:	<u>ml</u>
A'	1.0
B'	1.0
C'	0.1
D'	0.1
H ₂ O tridest.	7.8
BSA	150 mg
	<u>10 ml</u>

Ajustar a pH 7.4 amb HCl 1N i filtrar amb membrana de 0.22 μ m per esterilitzar.

MEDI M₁₆ i M₂

Solució mare A (x10 concentrada) (un mes, estèril, a +4°C)

	<u>g/100 ml</u>
NaCl	5.534
KCl	0.356
KH ₂ PO ₄	0.162
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.294
Lactat sòdic	2.608
Glucosa	1.000
Penicil.lina	0.060
Estreptomocina sulfat	0.050

Solució mare B (x10 concentrada) (dues setmanes a +4°C)

	<u>g/100 ml</u>
NaHCO ₃	2.106
Roig fenol	0.010

Solució mare C (x100 concentrada) (dues setmanes a +4°C)

	<u>g/10 ml</u>
Piruvat sòdic	0.036

Solució mare D (x100 concentrada) (un mes, estèril, a +4°C)

	<u>g/10 ml</u>
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.252

Solució mare E (x10 concentrada) (un mes, estèril, a +4°C)

	<u>g/100 ml</u>
Hepes	5.957
Roig fenol	0.010

Ajustar a pH 7.4 amb NaOH 5N abans de fer els 100 ml

Preparació

• M₁₆

solució mare:	<u>ml</u>
A	1.0
B	1.0
C	0.1
D	0.1
H ₂ O tridest.	7.8
BSA	40 mg
	<hr/> 10 ml

• M₂

solució mare:	<u>ml</u>
A	1.00
B	0.16
C	0.10
D	0.10
E	0.84
H ₂ O tridest.	7.80
BSA	40 mg
	<hr/> 10 ml

Ajustar-los a pH 7.4 amb HCl 1N i filtrar amb membrana de 0.22 µm per esterilitzar.

El medi T₆ ha d'ésser molt fresc i, per tant, es prepara al moment, el M₁₆ es pot quedar una setmana a 4°C fins i tot algun temps congelat a -20°C però això no és aconsellable.

El dia abans d'utilitzar-los es posen en càpsules de Petri de plàstic

rebutjable a l'incubador, a 37°C, amb una atmosfera al 5% CO₂ en aire i saturada d'humitat per tal d'equilibrar-los a l'ambient on tindrà lloc la fecundació. Els medis es posen sempre sota oli de parafina.

2.2.1.3. Altres solucions

A part dels medis de cultiu són necessàries altres solucions per manipular els gàmetes i embrions.

FORMALINA NEUTRA TAMPONADA

Solució emprada per fixar els espermatozoides abans de fer-ne un recompte.

	<u>mM</u>
formaldehid	3920.08
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	28.98
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	40.62

en aigua destil·lada ajustada a pH 7.4

HIALURONIDASA

Solució de 300 USP-E/ml Merck de testicle de bou. Hidrolitza l'àcid hialurònic que actua com a ciment intercel·lular de les cèl·lules de la granulosa que formen el cumulus oophorus. Estabilitzada en PBS amb 10 mg/ml de PVP (polivinil pirrolidona).

SOLUCIÓ ÀCIDA DE TYRODE

Emprada per dissoldre la zona pel·lúcida dels oòcits de ratolí.

	<u>mM</u>
NaCl	136.89
KCl	2.68
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.63
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.49
Glucosa	5.55
PVP	4 mg/ml

Ajustar a pH 2.5 amb HCl 1N (sense Hg contaminant)

2.2.2. Mètodes emprats (fig. 24)

2.2.2.1. Superovulació

Seguint els criteris esmentats en l'apartat 2.1.3. s'ha provocat la superovulació de les femelles de la següent manera:

<u>temps</u>	
-48 h	Injecció intraperitoneal de 7.5 ui de PMSG
0 h	Injecció intraperitoneal de 7.5 ui de HCG
13 a 14 h	Superovulació

2.2.2.2. Fertilització in vivo

APARELLAMENT

Immediatament després de la injecció de HCG es posen dues femelles a acoblar amb cada mascle. El mascle s'hi posa tot seguit per tal que hi hagi els espermatozoides al lloc de la fecundació un cop es doni l'ovulació. Així s'evita l'envelliment dels oòcits al tracte genital femení.

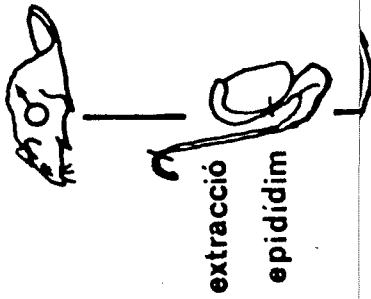
Al cap de dinou o vint hores se sacrifiquen les femelles. El lapse de temps entre l'última injecció i el moment en què són sacrificades és important. Si s'extreuen els oòcits massa d'hora pot ser que la fertilització no hagi tingut lloc encara. Si s'extreuen massa tard la massa de cèl.lules fol.liculars i zigots s'ha dispersat per l'acció dels espermatozoides. Són, per tant, més difícils d'obtenir i s'han de perfun-
dir els oviductes tal com descriurem a l'apartat següent.

D'altra banda aquest temps iguala l'estona en què estan en contacte els espermatozoides i oòcits a la FIV (6 hores) amb vista a augmentar la uniformitat dels tractaments a què són sotmesos els gàmetes en ambdòs casos.

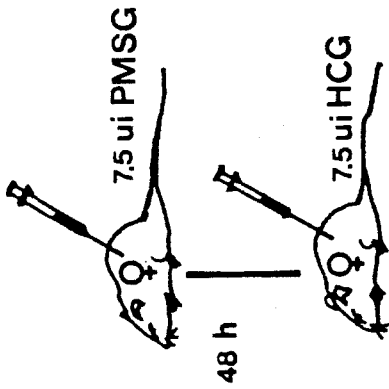
El mascle no torna a ser utilitzat en una altra fertilització de cara a augmentar el pool genètic estudiat.

Fig. 24.- Esquema general dels mètodes emprats, tant en la fertilització in vivo, com in vitro, com en l'estudi del mutagen β -propio-lactona.

IN VITRO



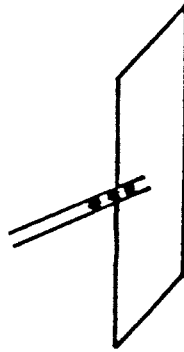
observació
2 P.N.
2 C.P.



ESTUDI
MUTAGEN

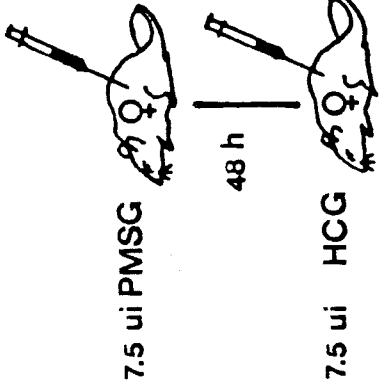
HSA
18-20 h

extensió
(met. Tarkowski)



bandes G — tinció — bandes C — det. sexe
uniforme

IN VIVO



RECOLLIDA D'EMBRIONS

Les manipulacions es fan dins la cambra de flux laminar i amb material estèril.

Els animals es maten per dislocació cervical. Aquest mètode evita la dissolució de substàncies (èter, cloroform) a la sang que podrien afec_{tar} negativament la viabilitat de gàmetes i embrions.

Els animals es desinfecten amb alcohol al 70%. Se'ls extreuen els oviductes i es dipositen en 0.4 ml de M_{16} amb 10^{-7} M de sulfat de vinblastina. Es posen al microscopi estereoscòpic on s'estripa l'ampul·la (engruiximent que conté la massa del cumulus oophorus i els zigots) i s'alliberen al medi.

En cas que el cumulus estigui disgregat no es distingeix l'ampul·la i s'ha de perfundir l'oviducte per la fímbria (allà on l'oviducte s'obre a la bursa que conté l'ovari) amb una agulla de 30G amb la punta esmussada. El sentit de perfusió ha d'ésser sempre d'ovari a úter perquè si no l'epiteli ciliat que recobreix l'oviducte impedeix que els embrions en surtin.

CULTIU

Un cop es tenen els embrions al medi es posen a l'incubador de CO_2 fins al moment de fer les preparacions.

2.2.2.3. Fertilització in vitro

També com el cas anterior, totes les manipulacions es fan dins la cambra de flux laminar i amb material estèril. És un bon ajut disposar d'una placa calefactora a $37^{\circ}C$ al costat a fi de mantenir el medi calent mentre es fa qualsevol manipulació (dispersió, dilució-capacitació, obtenció dels oòcits, canvi de medis, etc.)

OBTENCIÓ DELS GÀMETES MASCULINS - CAPACITACIÓ

Se sacrifica el mascle per dislocació cervical i es remulla amb alcohol

al 70%. Tot seguit se li estremen els epidídims caudals sense greix, i, amb l'ajut d'un paper de filtre net i pressionant lleugerament, es fa sortir tota la sang dels vasos capil.lars que l'envolten. És molt important treure tota la sang perquè si en va al medi els espermatozoides s'aglutinen i no s'obté una bona suspensió.

DISPERSIÓ

Mitjançant una lleugera pressió es fa sortir el fluid epididimal a 1 ml de medi T₆ sense BSA i es posa a l'incubador durant 20 minuts perquè es dispersin els espermatozoides.

Cal fer totes aquestes operacions ràpidament (en menys de deu minuts entre que es mata l'animal fins que es posa la suspensió d'espermatozoides a l'incubador) perquè els espermatozoides són molt sensibles a qual sevol canvi de l'ambient i s'aglutinen fàcilment.

DILUCIÓ-CAPACITACIÓ

Passats els vint minuts es controla la suspensió al microscopi estereoscòpic i s'observa que no hi hagi grumolls d'espermatozoides, i es dilueixen 1:9 en 0.4 ml de T₆ + BSA; on hi restaran cinquanta minuts dins l'incubador per a capacitar-se.

RECOMPTE

Simultàniament es pot fer la mateixa dilució amb formalina neutra tamporada per fixar els espermatozoides i fer un control de la concentració obtinguda mitjançant una cambra de Neubauer. La suspensió original (concentrada) té normalment una concentració de $1-2 \times 10^7$ esp./ml quedant, un cop feta la dilució, en $1-3 \times 10^6$ esp./ml.

OBTENCIÓ DELS GÀMETES FEMENINS - INSEMINACIÓ

Al cap de tretze o catorze hores després de la injecció de HCG es sacrifiquen dues femelles per cada mascle i es procedeix a l'extracció dels oviductes. Aquest, nets de sang, s'introdueixen a la suspensió d'espermatozoides capacitats. Allí es rebenten les ampul.les i s'alliberen els oòcits al medi per ser fecundats

CULTIU

Un cop inseminats es deixen a l'incubador de cinc a sis hores. Després es recullen els zigots i s'eliminen els espermatozoides sobrers i les cèl.lules del cumulus que ha estat disgregat.

Si es vol confirmar la fecundació els zigots nets es posen al microscopi invertit de contrast de fases on s'hi observen els dos pro-nuclis i sovint també els dos corpuscles polars (veure 3.3.).

Un cop nets es posen a 0.4 ml de M_{16} amb 10^{-7} de sulfat de vinblastina i es deixen de divuit a vint hores a l'incubador de CO_2 .

2.3. Metodologia experimental dels estudis citogenètics

2.3.1. Fixació

El mètode de fixació és molt important a l'hora d'obtenir preparacions analitzables d'una qualitat òptima que permetin una anàlisi acurada dels resultats.

En general les variacions del mètode de Tarkowski (1966) d'assecat a l'aire són les que donen més bons resultats en aquest tipus de material i són, per tant, les més àmpliament utilitzades.

S'han emprat dues variants d'aquesta tècnica:

MÈTODE 1

- . Els zigots bo i nets de cèl.lules fol.liculars (en cas de la fertilització in vivo és convenient afegir al medi uns deu minuts abans de començar una alíquota de HSA per dipersar les cèl.lules del cumulus) es posen de set a nou minuts en hipotònic (CIK 0.075 M).

- . Se n'agafen tres amb una micropipeta i es posen, sota el microscopi estereoscòpic, en una gota molt petita sobre un portaobjectes desengrassat amb alcohol:èter (1:1) i net de pols. La gota d'hipotònic ha d'ésser prou petita com per impedir que s'assequin, però no pot ésser gaire gran per evitar la dispersió i pèrdua dels zigots.

- . Es tira una gota de fixador de Carnoy (metanol:àcid acètic; 3:1) damunt els zigots i es posa a l'escalfor d'una bombeta de 100W esmerilada.

- . Quan es dispersa el fixador els embrions apareixen com a punts brillants i aleshores s'assenyala llur situació amb un marcador per la banda inferior del portaobjectes.

- . Bufant suaument es fa l'assecat total.

. Després es podrà resseguir el senyal del marcador amb un llapis de diamant per fer la marca duradora.

Valoració:

Si bé amb la utilització d'aquest mètode no apareixen gaire sovint les pèrdues de complements cromosòmics sí que és molt difícil d'aconseguir preparacions prou netes de citoplasma tal com requereixen les tècniques de bandeig cromosòmic.

MÈTODE 2

. Cal prèviament preparar portaobjectes amb quatre quadrats marcats d'aproximadament 6x6 mm posats a desengrassar amb alcohol: èter (1:1).

. Els tractaments amb HSA i hipotònic són iguals que en el mètode anterior.

. Acabat el tractament amb hipotònic s'agafen tres zigots i es posen en una gota de la mida adequada al centre del quadrat per la banda no marcada del portaobjectes.

. Amb una pipeta Pasteur estirada a la flama es tira una gota de Carnoy.

. Controlant sota el microscopi estereoscòpic es veu on van a parar els zigots (si surten del quadrat cal assenyalar-los amb el llapis de diamant, però és millor evitar-ho perquè en ratllar el portaobjectes la preparació s'omple de vidrets que l'embruten.

. Es bufa suaument i s'afegeix una altra gota de fixador.

. S'eixuga el quadrat següent i es repeteix la mateixa operació en cadascun dels quadrats.

. Un cop fet el darrer es tira una gota més de fixador a cada quadrat per evitar deposicions d'hipotònic que embrutarien la preparació.

. Es deixa assecar a l'aire.

Valoració:

Aquest segon mètode proporciona, pel fet d'afegir-hi més fixador, unes preparacions més aptes per al bandeig cromosòmic perquè tenen menys restes de citoplasma que no pas el primer. Té, però, el perill que si l'acció del fixador és massa dràstica es disgrega la primera metafase zigòtica i sovint es perden cromosomes i complements sencers de l'embrió.

En general ambdós mètodes presenten certs inconvenients. El fet de no poder fer un tractament massiu de les cèl.lules, de manera que s'hagi d'anar fixant en grups poc nombrosos (de tres en tres), fa que aquesta tècnica esdevingui lenta, tediosa i que impedeixi tractar amb moltes cèl.lules alhora, de manera que l'amplitud de la mostra ha d'augmentar a base de repetir els experiments.

D'altra banda cada grup fixat té unes característiques (extensió, restes de citoplasma, etc.) diferents dels altres, malgrat estar en el mateix portaobjectes. Aquesta circumstància dificulta extraordinàriament les tècniques de bandeig, fonamentalment la de bandes G.

Per altra part les superposicions i pèrdues cromosòmiques relativament freqüents fan que la indicència de monosomies detectada sigui més elevada del que caldria esperar.

Contràriament, la qualitat de les preparacions i el fet de tractar els embrions gairebé d'un a un fa que les pèrdues de material analitzable siguin mínimes.

2.3.2. Tinció

La tinció es duu a terme amb colorant de Leishman en proporció 1:4 amb tampó de Lieshman a pH 6.8

2.3.2.1. Uniforme

- Es posen les preparacions al colorant durant quatre minuts.

. S'esbandeixen amb aigua de l'aixeta i s'assequen amb molta cura amb un paper de filtre.

2.3.2.2. Bandes C

Les bandes C són una tècnica que tenyeix les zones heterocromàtiques dels cromosomes. En el ratolí aquestes se situen al voltant dels centròmers. A més el cromosoma Y és bandes C negatiu i es tenyeix uniformement d'una manera més intensa. Aquest fet ha permès identificar-lo i determinar el sexe dels embrions bandejats (fig. 25).

La tècnica segons Sumner (1972) és la següent amb lleugeres variacions:

. Posar les preparacions acabades de fer de vint a trenta minuts a l'estufa a 110°C per envellir-les.

. L'endemà deixar-les durant trenta minuts en HCl 0.2N acabat de preparar.

. Esbandir en aigua destil.lada.

. Posar-les en una cubeta de tinció amb Ba (OH)₂ al 2% (solució saturada) a 60°C de mig a dos minuts (aquest temps varia segons l'antiguitat de les preparacions).

. Rentar amb aigua destil.lada i metanol.

. Posar durant noranta minuts en 2xSSC a 65°C.

. Rentar amb aigua de l'aixeta.

. Assecar amb paper de filtre.

. Tenyir amb colorant durant quatre minuts.

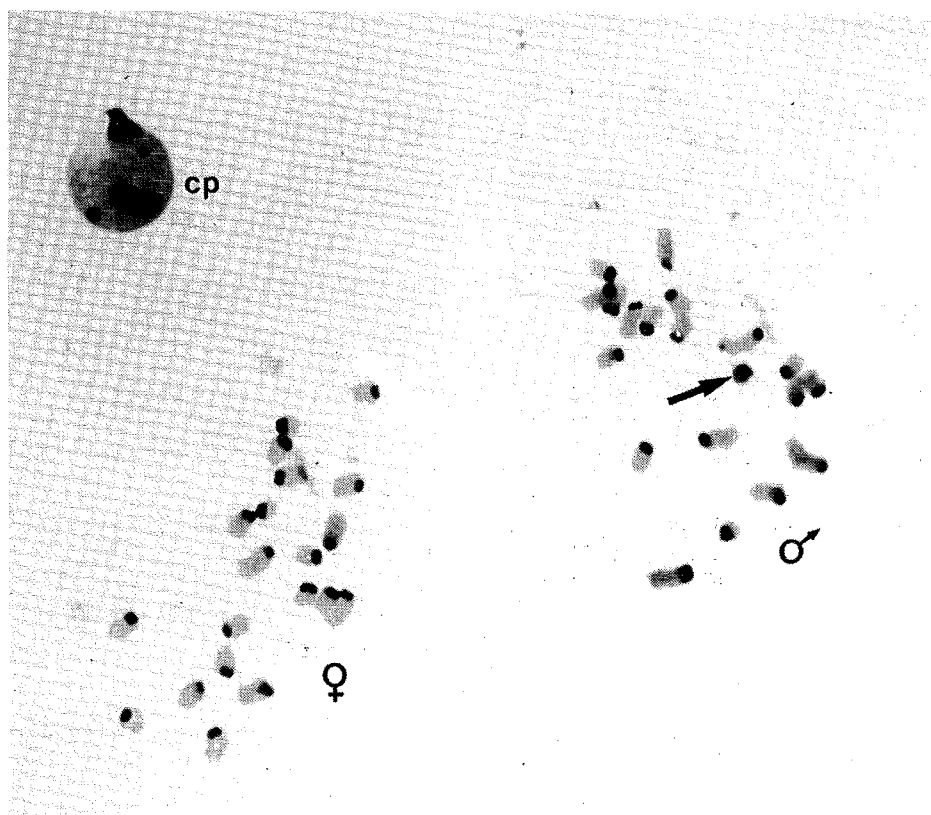


Fig. 25.- Cromosomes d'un embrió mascle tenyit amb bandes C, segons la tècnica de Sumner (1972) modificada. En el complement d'origen patern s'hi distingeix clarament el cromosoma Y (fletxa) (cp: segon corpuscle polar).

2.3.2.3. Bandes G

La tècnica de bandes G dóna resultats molt variables en cada preparació i àdhuc en cada metafase d'una mateixa preparació.

És, per tant, una tècnica que malmet material fins que es troben les condicions idònies de treball.

En el cas concret de la primera divisió embrionària en la que es treballa amb un nombre reduït de cèl.lules cada preparació malmesa pot ser important.

Per tant s'han fet intents de bandeig amb més o menys fortuna, obtenint algunes preparacions de bona qualitat però en un nombre tan limitat que no han estat incloses als resultats (fig. 26).

La tècnica emprada segons Gallimore i Richardson (1973) és la següent:

- . Envellir a 110°C durant vint minuts.
- . Posar els portaobjectes en una solució de 2xSSC a 65°C durant treta minuts.
- . Esbandir amb aigua de l'aixeta i assecar amb paper de filtre.
- . Posar de tres a quatre segons en una solució de tripsina al 0.5% en tampó de Leishman.
- . Esbandir amb aigua corrent.
- . Assecar amb paper de filtre.
- . Tenyir tres o quatre minuts amb colorant.

2.3.3. Observació

L'observació s'ha fet amb un microscopi òptic Leitz Dialux 20 a 100, 630 i 1000 augments. Dels casos més interessants se n'ha fet fotografies el processat de les quals ha estat l'habitual.



Fig. 26.- Complement cromosòmic patern d'un embrió en la primera divisió embrionària tenyit amb bandes G segons una modificació de la tècnica de Gallimore i Richardson (1973).

2.4. Estudi de mutàgens

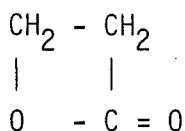
2.4.1. Característiques i propietats del mutagen emprat

S'ha triat la **β**-propiolactona (**β**PL) per a l'estudi de la mutagènesi perquè és un agent alquilant de reconegut poder mutagènic en bacteris, llevats i plantes, però ha estat molt poc estudiat en mamífers perquè té una mitjana de vida d'acció curta i és poc difusible per l'organisme. Ambdues circumstàncies fan que els tests clàssics de detecció de mutàgens en mamífers hagin donat resultats negatius i/o contradictoris.

Pensem que la nostra metodologia de tractament de les femelles i estudi de la primera divisió embrionària ofereix unes característiques òptimes (veure 1.7) que permeten obviar aquestes dificultats i dur a terme l'anàlisi de llur efecte sobre les cèl.lules germinals de la femella.

2.4.1.1. Característiques físico-químiques

La **β**PL és un anell de quatre membres altament reactiu amb un pes molecular de 72.06 D:



És relativament soluble en aigua (37% v/v) i s'hidrolitza amb força rapidesa en solució aquosa (50% en 3 h a 35°C) per produir àcid **β**-hidroxi propiònic, el qual és relativament inocu. Per contra és estable durant diversos anys a 4°C.

A causa de la seva elevada reactivitat amb les molècules biològiques ha estat correntment utilitzada com a aerosol per esterilitzar habitacions i plasma sanguini. S'ha demostrat que és un bon descontaminador de la fase vapor en el tractament d'àrees tancades, essent efectiva contra es pores i cèl.lules vegetatives bacterianes així com contra virus, als quals inactiva. S'ha proposat també com a additiu a la llet abans dels

processos fermentatius per inhibir l'aparició de Bactobacillus casei.

D'altra banda, la **BPL** posseix un ampli ventall d'usos industrials, com per exemple la utilització en el processat de la fusta, en la impermeabilització de la roba, en la modificació de la cel.lulosa de lli, en la manufactura d'escuma d'uretà; també serveix d'intermediari en la fabricació d'insecticides, plastificadors, productes medicinals, i com additiu es fa servir per gasolines amb alt contingut de plom i en la modificació de l'aroma de tabac (Fishbein i col., 1970).

2.4.1.2. Activitat biològica

Tal com hem vist, la **BPL** té una elevada reactivitat amb els centres nucleofílics com poden ser els de les proteïnes i els àcids nucleics. Aquesta capacitat de reacció és la que li confereix el caràcter mutagènic i d'inductor d'anomalies cromosòmiques.

La **BPL** actua com a agent alquilant del DNA, reaccionant fonamentalment amb la guanina i donant com a resultat o bé una depurinització, o bé una forma ionitzada capaç de formar ponts d'hidrogen amb la timidina. Aquests canvis provocaran anomalies en l'aparellament de bases (transicions i transversions).

També indueix la formació de ponts entre dues cadenes del DNA i, a altes concentracions, provoca la desnaturalització localitzada de parts del DNA, de manera que els extrems lliures de diferents cadenes s'unixen formant grans complexos (Brusick, 1977).

Quant a les proteïnes sembla que la seva capacitat d'unió és dues vegades superior a la dels àcids nucleics, fonamentalment amb els grups -SH- i -S-S- dels aminoàcids metionina, cisteïna i cistina i, amb menor intensitat, amb la histidina, prolina i lisina, dins d'una àmplia gamma de pH que va des del pH 3 fins al pH 9.

S'ha descrit també la formació de complexos DNA-proteïnes després del tractament de DNA i proteïnes de membrana in vitro. Es desconeix encara la natura d'aquestes unions i està per determinar el significat biològic d'aquests complexos DNA-membrana, especialment pel que fa a les propie-

tats carcinògenes d'aquest compost (Brusick, 1977).

2.4.2. Metodologia experimental (fig. 24)

La metodologia experimental emprada ha consistit en injectar intraperitonealment a les femelles de ratolí de 24-28 dies la β PPL amb una concentració de: 2 mg/Kg pes d'animal en aigua tridestil·lada.

Les solucions es preparen immediatament abans d'utilitzar o bé, quan això no és possible, són congelades a -20°C per tal d'evitar la desnaturalització del producte.

Les injeccions del mutagen han tingut lloc a cinc temps diferents després de la injecció de HCG per tal d'afectar les següents fases de la meiosi:

1 1/2 h	Darreres fases de la profase I
3 h	Immediatament abans de la metafase I
6 h	Anafase I
9 h	Telofase I - Profase II
11 h	Immediatament abans de la metafase II

(veure 2.1.3.)

Després es procedeix a una fertilització, ja sigui in vivo o in vitro (segons el que convingués en cada cas), aturant la primera divisió embrionària i estudiant la dotació cromosòmica dels embrions obtinguts, com ja hem descrit.

Els resultats han estat comparats després amb la mostra control corresponent i confrontats amb la dotació cromosòmica dels progenitors no tractats (mascles) de la mateixa mostra d'embrions.

3. RESULTATS

Els primers resultats s'han obtingut en desenvolupar la tècnica de la FIV.

S'ha començat per assegurar l'obtenció de gàmetes, tant masculins com femenins, de bona qualitat per a ésser fecundats, per a després passar a la inseminació i observació de característiques del desenvolupament.

3.1. Característiques dels gàmetes obtinguts

3.1.1. Oòcits

Per a dur a terme la tècnica de la FIV s'ha induït l'ovulació d'un total de 1.842 oòcits, dels quals el 85.18%, es a dir, 1.569 eren fecundables i la resta, el 14.82%, eren atrèsics o immadurs i, per tant, no eren aptes per a ser fecundats.

Els processos d'estimulació i manipulació hormonal del cicle indueixen l'aparició d'oòcits anòmals entre els ovulats normalment. En general els oòcits que es troben a l'oviducte es poden classificar en:

OÒCITS IMMADURS

. En fase de dictiotè: Ovulats abans de la represa de la meiosi i típicament fol·liculars. Aquests oòcits són fàcilment distingibles ja que presenten la vesícula germinal (nucli profàsic) intacte, no tenen corpuscle polar i acostumen a anar acompanyats d'un cumulus oophorus molt persistent. Es troben en comptades ocasions (fig. 27).

. En metafase I: O bé són ovulats abans d'arribar a la metafase II o bé no conclouen la meiosi a l'oviducte com seria d'esperar (veure 2.1.3.). Són més freqüents que els anteriors. Difícilment es distingeixen dels normals (en la metafase II) ja que tant en uns com en altres el primer corpuscle polar sovint es malmet (fig. 28).

Cap d'aquests dos tipus d'oòcit són fecundables i encara que puguin ser penetrats, no es dona el desenvolupament del pro-nucli masculí.

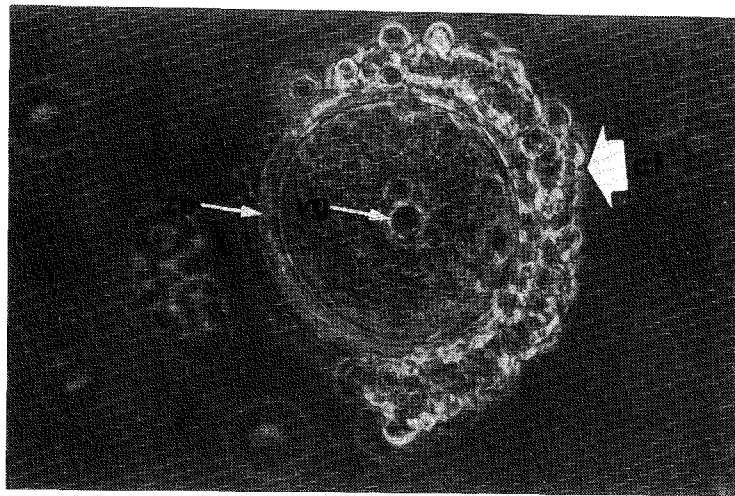


Fig. 27.- Oòcit immadur amb vesícula germinal (en dictiotè), fotografada al microscopi invertit de contrast de fases. S'hi observen cèl.lules fol.liculars adherides encara a l'oòcit formant restes del cumulus oophorus (vg: vesícula germinal, cf: cèl.lules fol.liculars, zp: zona pel.lúcida). (Foto V. Català).



Fig. 28.- Cromosomes en metafase I obtinguts d'un oòcit de ratolí ovulat per inducció hormonal externa (superovulació)

OÒCITS ATRÈSICS I DEGENERATS

La majoria d'oòcits no fecundables pertanyen a aquesta categoria. Són oòcits amb una severa degeneració citoplasmàtica que es tradueix en una fragmentació i/o col.lapse del vitel.lus. En altres casos més extrems s'observen àdhuc zones pel.lúcides buides (fig. 29).

OÒCITS MADURS

Són els aptes per a ser fecundats. Es troben en la metafase II (fig. 30) i envoltats d'una massa de cèl.lules fol.liculars que els uneixen els uns amb els altres. Presenten normalment un corpuscle polar, encara que a vegades es pugui destruir quedant una resta citoplasmàtica a l'espai perivitel.lí (fig. 31).

En comptades ocasions es pot produir la no extrusió del primer corpuscle polar quedant els cromosomes de l'oòcit com en una metafase II doble (fig. 32). Només se'n detecta un cas que no va ésser fecundat, però aquest mecanisme podria ser la causa d'alguna de les poliploïdies trobades d'origen incert.

3.1.2. Espermatozoides

Els paràmetres més emprats per a determinar la qualitat dels gàmetes masculins són dos:

LA MOTILITAT

Els espermatozoides de l'epidídim caudal han de presentar una motilitat cap endavant quan es troben en suspensió. Aquesta motilitat implica que la suspensió sigui com més uniforme millor, sense grumolls que representen l'aglutinació dels espermatozoides pel cap, signe evident de la mort cel.lular (fig. 33).

Aquest moviment es transforma en hiperactivació després del cultiu dels espermatozoides en medi amb BSA, la qual cosa indicarà llur capacitat.

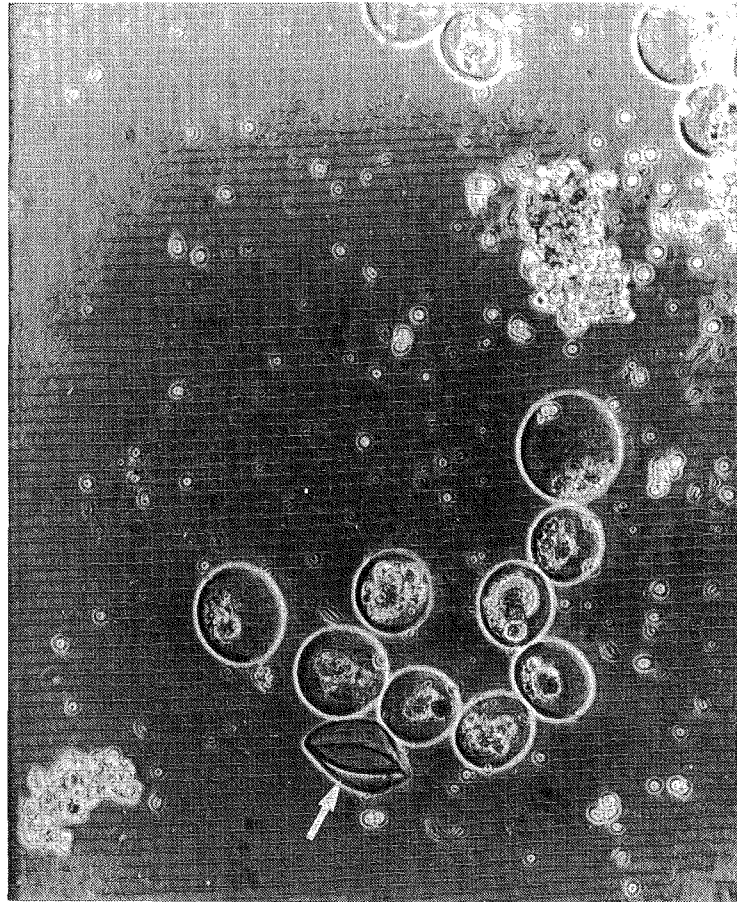


Fig. 29.- Oòcits amb degeneració i col.lapse citoplasmàtic acompanyats de cèl.lules fol.liculars tal com es veuen al microscopi invertit de contrast de fases després d'haver dispersat el cumulus oophorus amb hialuronidasa. La fletxa assenyala una zona pel.lúcida buida. (Foto V. Català).

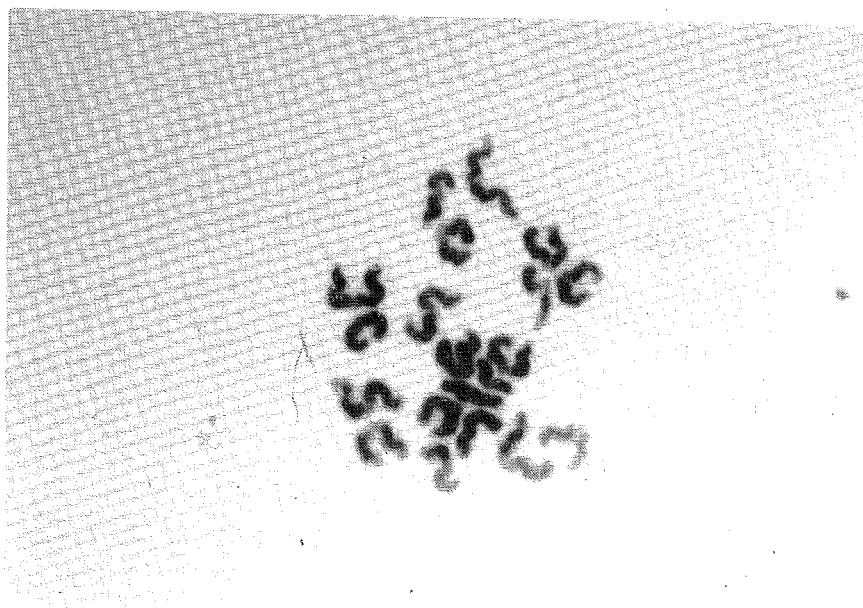


Fig. 30.- Aspecte dels vint cromosomes d'un oòcit madur de ratolí ovulat en la metafase de la segona divisió meiótica. S'observa clarament l'anomenada repulsió entre cromàtides típica d'aquesta fase.

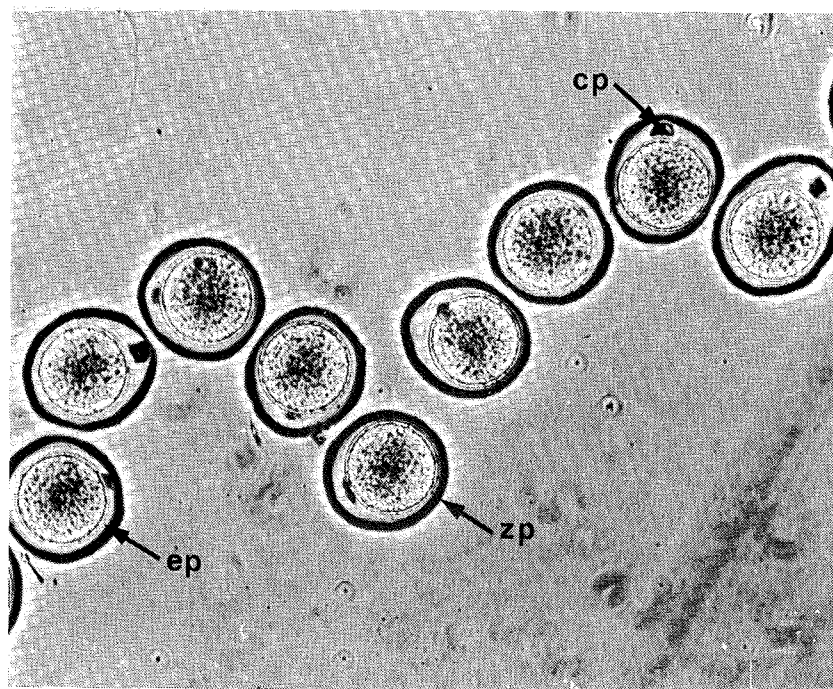


Fig. 31.- Oòcits madurs sense el cumulus al microscopi invertit de contrast de fases (zp: zona pel.lúcida, ep: espai perivitel.lí, cp: primer corpuscle polar).

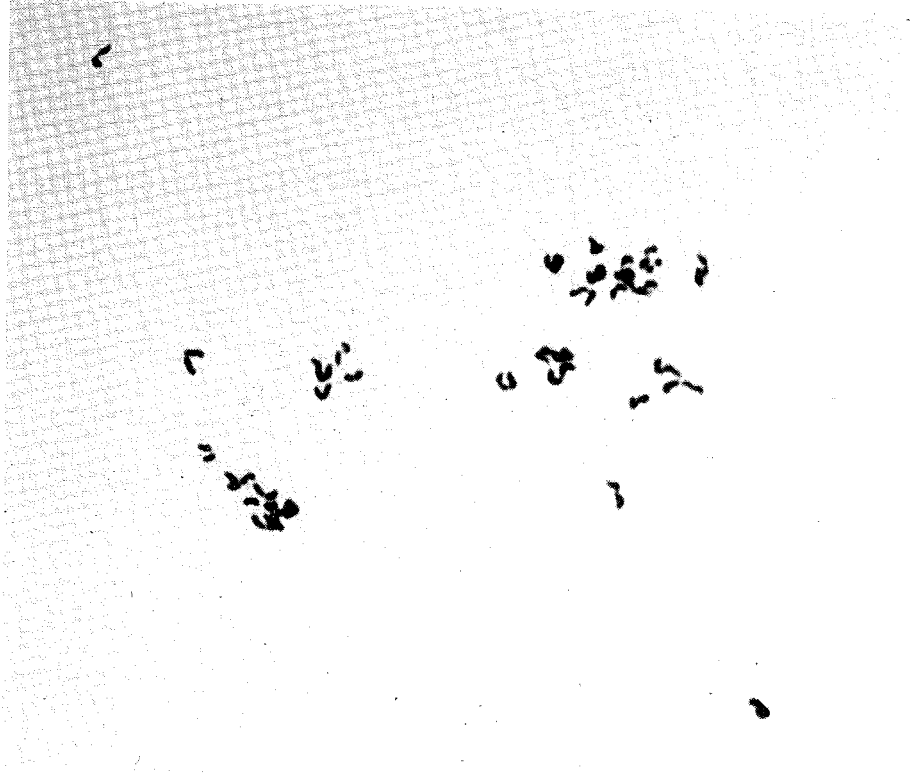


Fig. 32.- Metafase II amb quaranta cromosomes (doble) a causa de la no-extrusió del primer corpuscle polar al final de la primera divisió meiótica.

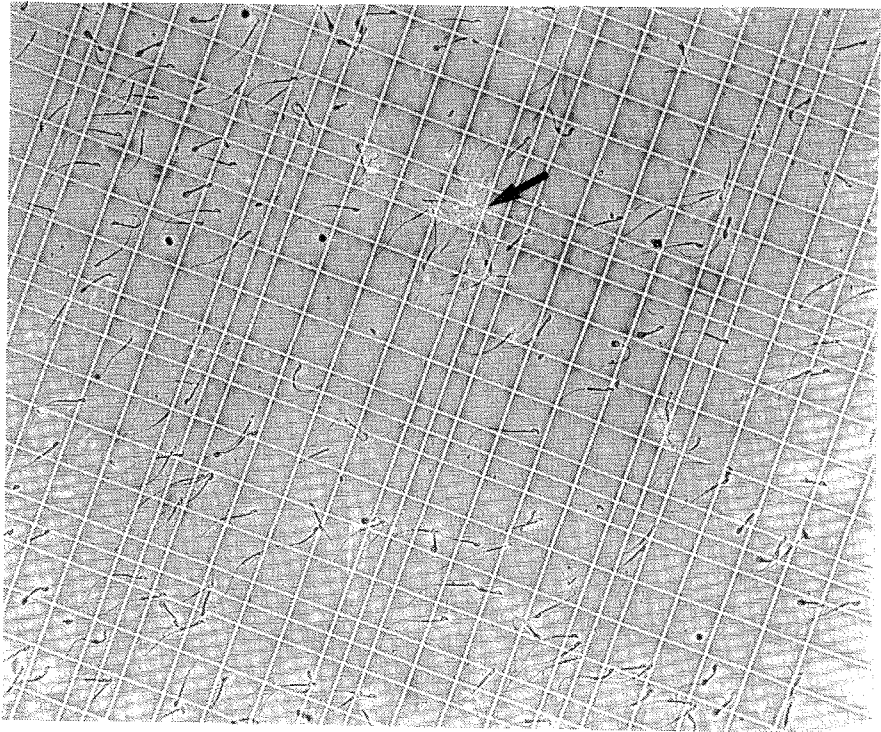


Fig. 33.- Reticle d'una cambra de Neubauer amb espermatozoides per a fer-ne un recompte al microscopi invertit de contrast de fases. Cal tenir en compte que només es compten els caps, deixant de banda les cues. La fletxa assenjala una aglutinació d'espermatozoides que indica la mort cel.lular.

LA CONCENTRACIÓ

Tal com hem descrit en 2.1.5.3. la concentració d'espermatozoides és un paràmetre molt important a tenir en compte a l'hora de fer una FIV. Per aquesta raó en alguns experiments es van fer recomptes del nombre d'espermatozoides amb una cambra de Neubauer (fig. 33) (veure 2.2.2.3.).

En tots el casos s'han obtingut unes concentracions que oscil·len entre 1 i 2×10^6 esp./ml

3.2. Inseminació in vitro

S'han realitzat 17 experiments de FIV en la població control amb un total de 1.842 oòcits inseminats, dels quals 273 s'han retirat en fer el canvi de medi de cultiu per estar degenerats o atrèsics.

Dels 1.569 potencialment fecundables, 1.284 en foren, la qual cosa representa un 81.82% d'eficiència de fecundació (Taula 1).

Al moment de ser recollits els zigots per passar-los al medi de cultiu hi ha indicadors del bon resultat de la fecundació. En general els espermatozoides estaven aglutinats amb les cèl·lules fol·liculars, amb les quals tenen gran afinitat, o bé entre ells. D'altra banda els oòcits tenien gran quantitat d'espermatozoides adherits a la zona pel·lúcida que els feien girar gràcies al vigorós batec flagel·lar (fig. 34). Normalment aquest moviment s'interpretava com un indicatiu de que la fecundació havia estat efectiva (fig. 35).

TAULA 1.- Característiques generals de la mostra d'embrions fecundats
in vivo i in vitro.

	<u>IN VIVO</u> (%)	<u>IN VITRO</u> (%)
Embrions fecundats	1291	1284
Embrions analitzats	1022	1033
Eficiència de fertilització	(82.60)	(81.82)
Relació de sexes		
	♂ 52 (50.98)	93 (55.03)
	♀ 50 (49.02)	76 (44.97)

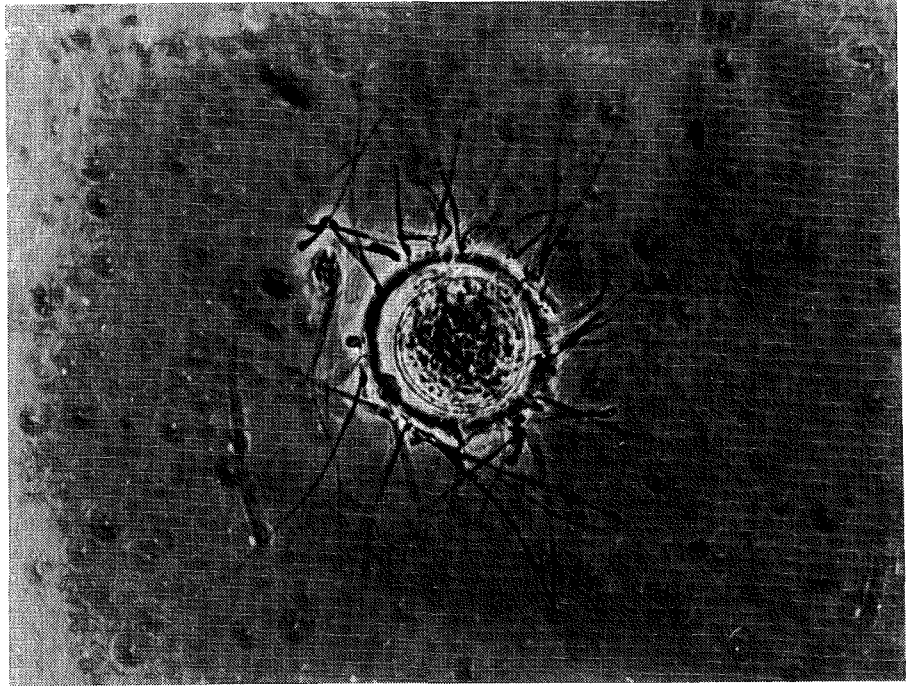


Fig. 34.- Oòcit de ratolí inseminat in vitro al microscopi invertit de contrast de fases amb nombrosos espermatozoides adherits a la zona pel.lúcida. L'acció dels espermatozoides ha dispersat el cumulus oophorus i les cèl.lules fol.liculars apareixen disgregades, com a punts brillants al fons. La mostra ha estat fixada amb formalina neutra tamponada per evitar el batec flagel.lar dels espermatozoides.

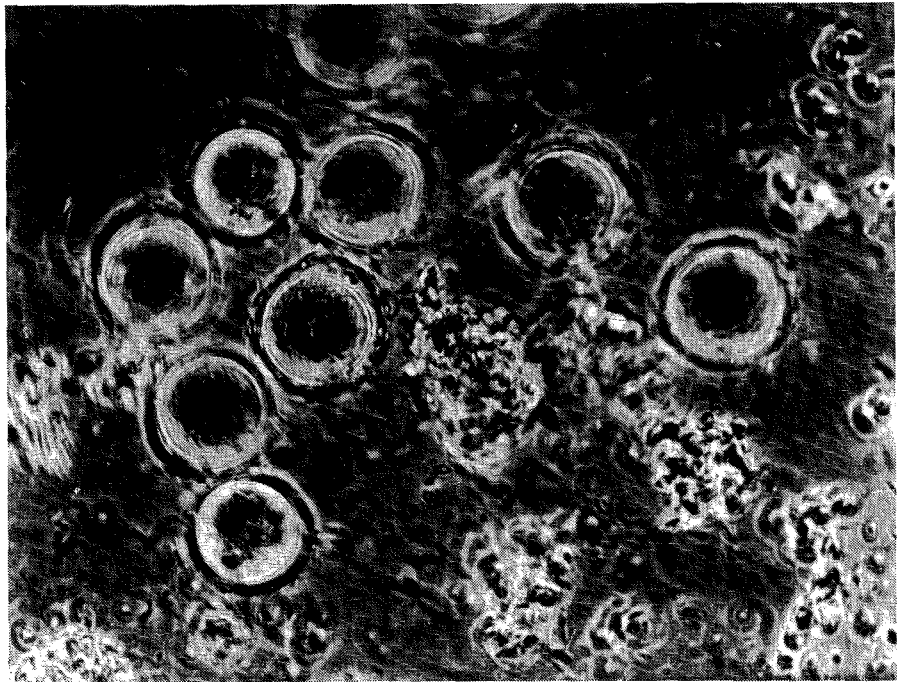


Fig. 35.- Oòcits de ratolí inseminats in vitro. Els nombrosos espermatozoides que tenen adherits a la zona pel.lúcida els fan girar mercès al seu vigorós moviment flagel.lar. Els grumolls que s'hi observa són cèl.lules fol.liculars dispersades pels espermatozoides.

3.3. Desenvolupament

En alguns casos s'han observat els zigots un cop fecundats a fi d'estimar el bon funcionament de la FIV a través de criteris morfològics de fecundació.

Generalment l'observació de dos pro-nuclis i dos corpuscles polars al cap de sis hores de la inseminació en diversos zigots feia preveure una bona taxa de fertilització en l'experiment en concret (fig. 36)

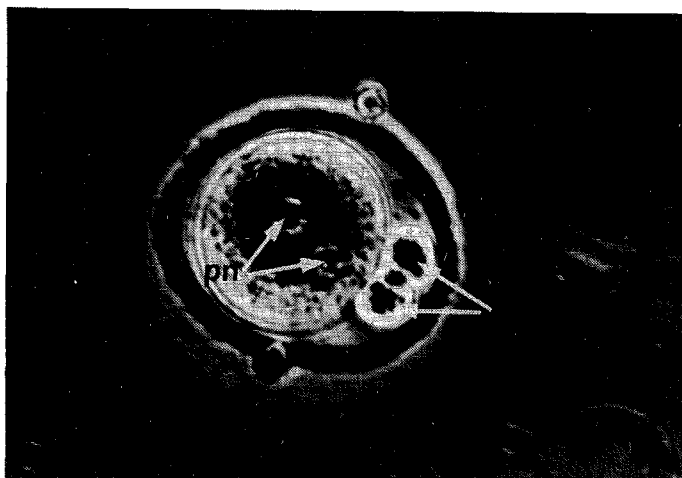


Fig. 36.- Aspecte que ofereix un zigot de ratolí fecundat in vitro al microscopi invertit de contrast de fases. Es distingeixen clarament els dos corpuscles polars (cp) i els dos pro-nuclis (pn), signe evident de que ha estat fecundat. Sobre la zona pel.lúcida s'hi observen dues cèl.lules fol.liculars que hi romanen adherides.

3.4. Primera divisió embrionària

La primera divisió embrionària en mamífers té unes característiques que la converteixen en un bon material per a l'estudi dels gàmetes tant masculins com femenins.

D'una banda totes les anomalies detectades són d'origen meiótic ja que no hi ha possibilitat que es produeixin en estadis posteriors a la fecundació. D'altra banda els embrions no han estat subjectes a cap pressió selectiva del tracte genital femení que elimini els anòmals per la qual cosa són detectats tots els zigots anormals.

Aquests fets permeten una anàlisi cromosòmica que dóna informació tant dels esdeveniments que tenen lloc durant la fecundació com els processos meiótics de producció de gàmetes.

3.5. Descripció de les anomalies cromosòmiques estudiades

3.5.1. Definició

El ratolí presenta quaranta cromosomes, tots ells acrocèntrics (fig. 37).

Com ja hem vist, els complements masculí i femení queden separats per l'acció de l'antimitòtic que impedeix l'emigració dels pro-nuclis però no la condensació en cromosomes de manera que es poden distingir l'un de l'altre pel seu grau de condensació cromosòmica. Així, doncs, els cromosomes del pro-nucli femení estan més condensats i generalment més dispersos que no pas els del masculí (fig. 38).

3.5.2. Anomalies estudiades

ANEUPLOIDIES

N'hi ha de dos tipus:

- . Hiperploïdies: És l'aparició de cromosomes de més. El cas més freqüent són les trisomies que suposen un sol cromosoma extra ($2n+1$) (fig. 39, 40). S'han observat també trisomies múltiples en una proporció més baixa (fig. 41).

- . Hipoploïdies: És la pèrdua de cromosomes. La més comuna és la monosomia que implica un complement del tipus ($2n-1$), tot i que també poden haver monosomies múltiples o nulisomies.

POLIPLOÏDIES

Són múltiples superiors a dos del nombre haploide de cromosomes.

- . Triploïdies ($3n$): Produïdes per una dispèrmia (fig. 42), per la fecundació d'un espermatozoide diploide (fig. 43) o per la no extrusió del segon corpuscle polar, és a dir, la fecundació d'un oòcit diploide (fig. 44).

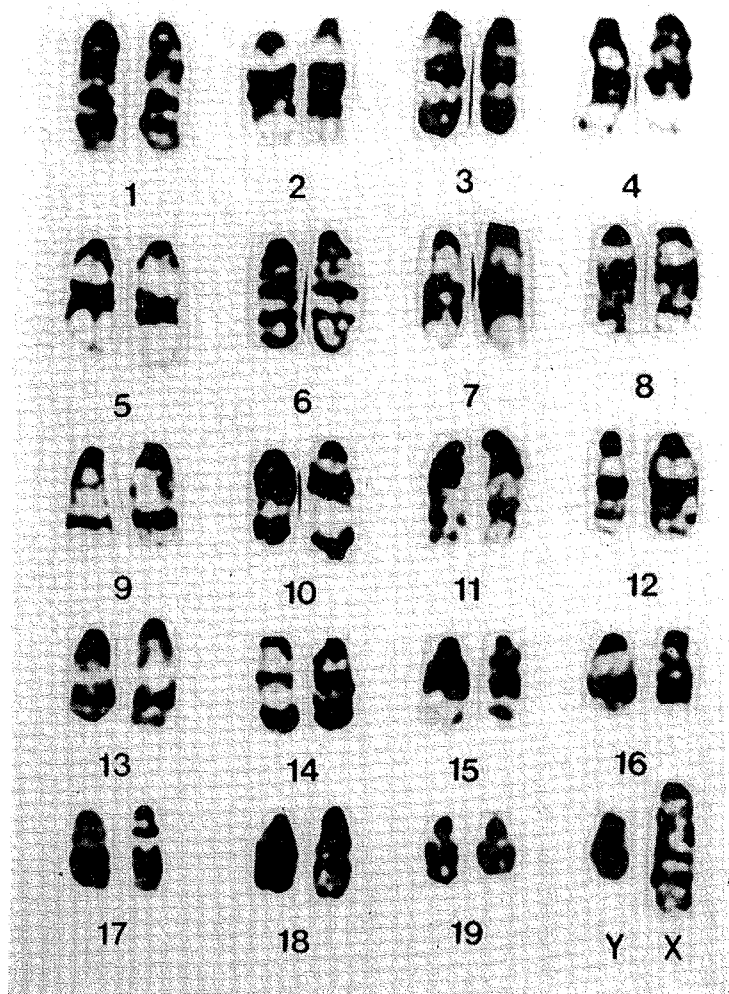


Fig. 37.- Cariotip del complement cromosòmic somàtic de ratolí, Mus musculus (Cowell, 1984).

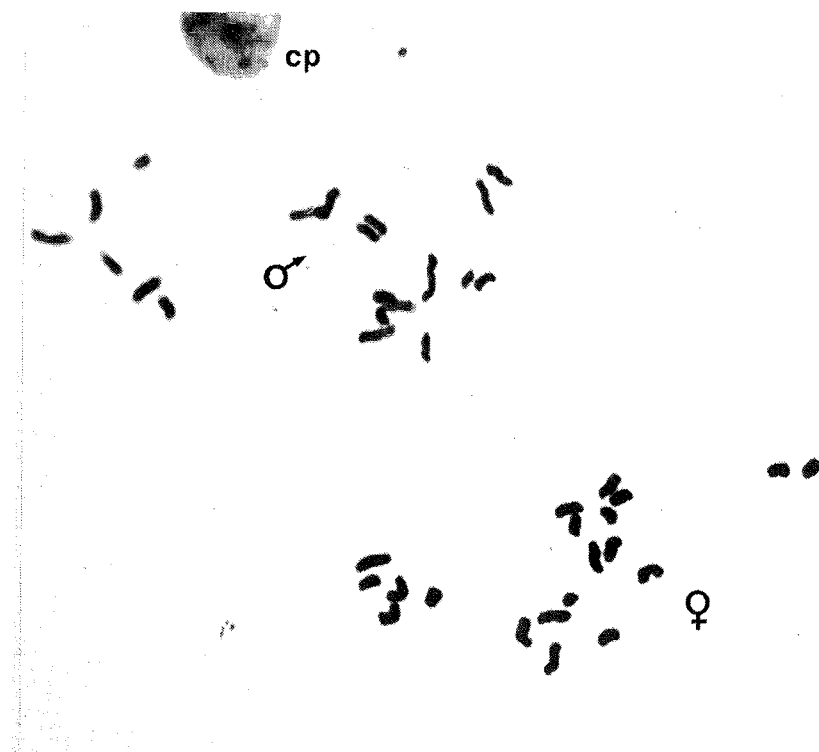


Fig. 38.- Metafase de la primera divisió embrionària de ratolí abans de la singàmia. Els cromosomes d'origen patern, menys condensats, es distingeixen clarament dels d'origen matern (cp: segon corpuscle polar).

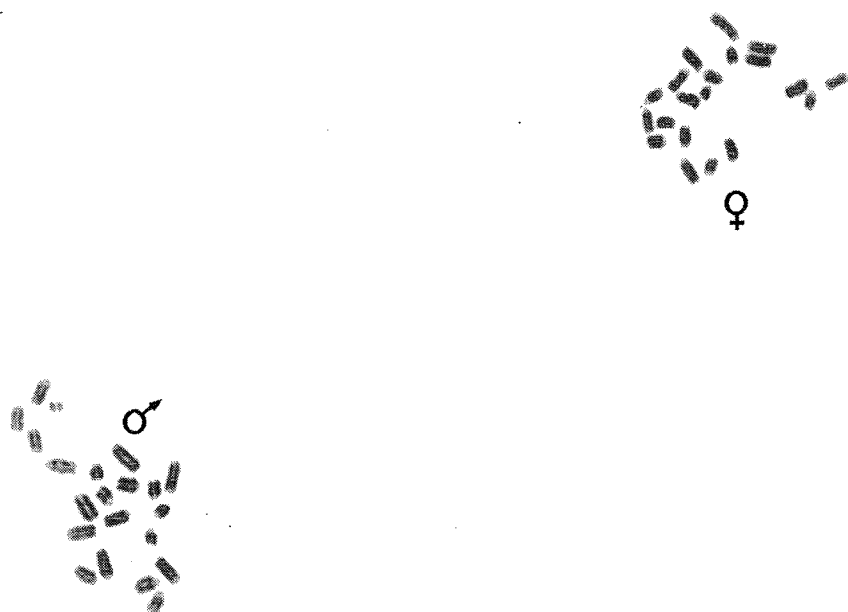


Fig. 39.- Metafase de la primera divisió embrionària. El complement masculí presenta una hiperploïdia (21 cromosomes).



Fig. 40.- Figura semblant a la 39. En aquest cas, però, és el complement femení el que és hiperploide amb 21 cromosomes.



Fig. 41.- Complement d'origen patern amb 25 cromosomes (hiperploïdia múltiple). El complement matern d'aquest embrió, que no apareix en la fotografia, contenia un nombre normal de cromosomes (20).

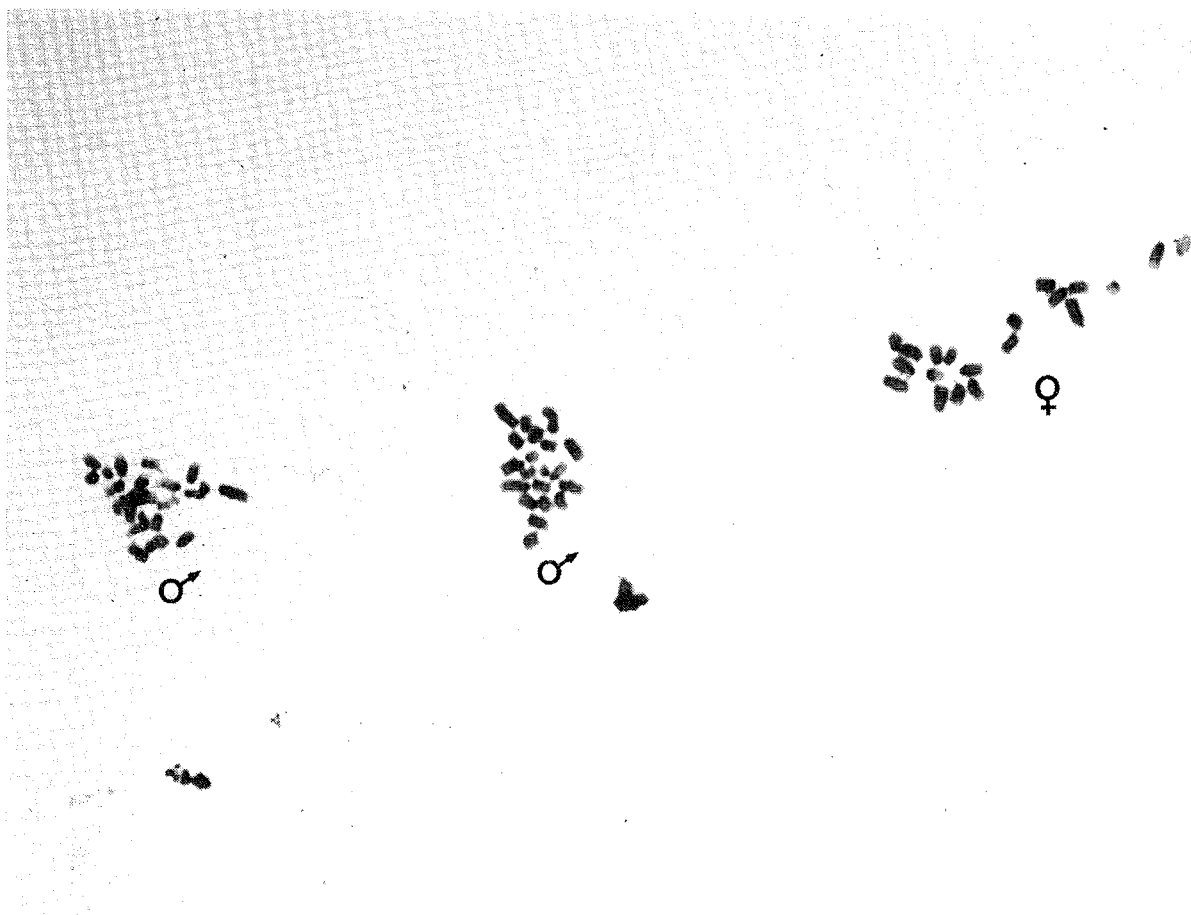


Fig. 42.- Embrió triploide originat per la penetració de dos espermatozoides (dispèrmia). Els dos complements patèrns romanen ben diferenciats i fàcilment distingibles del matern.



b



Fig. 44.- Embrió triploide d'origen femení, a causa de la no-extrusió del segon corpuscle polar. El grau de condensació cromosòmica d'ambdós complements indica el seu respectiu origen. Si bé el fet de no observar-se cap corpuscle polar a les proximitats de l'embrió abona la identificació de llur origen femení, aquest no és un criteri definitiu, ja que el corpuscle pot haver marxat per efecte de la fixació.

. Tetraploïdies (4n): Molt menys freqüents que les anteriors. Originades per trispèrmies (fig. 45) o bé per dispèrmies amb un espermatozoide diploide (fig. 46).

. Pentaploïdies (5n): Molt poc freqüents. El gran nombre de cromosomes (100) de l'embrió fa difícil de distingir-ne l'origen (fig. 47).

ANOMALIES ESTRUCTURALS

Les anomalies estructurals inclouen fragments, anells i fusions centríques (fig. 48). En general són fragments cromosòmics l'origen dels quals, en aquesta mostra, és difícil de determinar. Els rearranjaments són més infreqüents i la seva incidència és tan baixa que no és possible l'anàlisi estadística de les dades obtingudes, per la qual cosa s'han agrupat amb els anteriors.

3.5.3. Casos especials

3.5.3.1. Analitzables

Quan els zigots són posats al medi antimitòtic massa tard com perquè aquest impedeixi la singàmia, els dos complements apareixen barrejats (quaranta o seixanta cromosomes) (fig. 49). En aquests casos no es pot esbrinar l'origen de l'anomalia i, per tant, apareix només com a pertanyent a un embrió.

3.5.3.2. No analitzables

En una part de la mostra no es pogueren estudiar les característiques citogenètiques dels embrions, fonamentalment per quatre raons:

. L'acció de l'antimitòtic no era prou perllongada o bé es produïa una mort cel·lular en els primers estadis de condensació cromosòmica. Els cromosomes apareixen massa profàsics com per a ser analitzats (fig. 50).

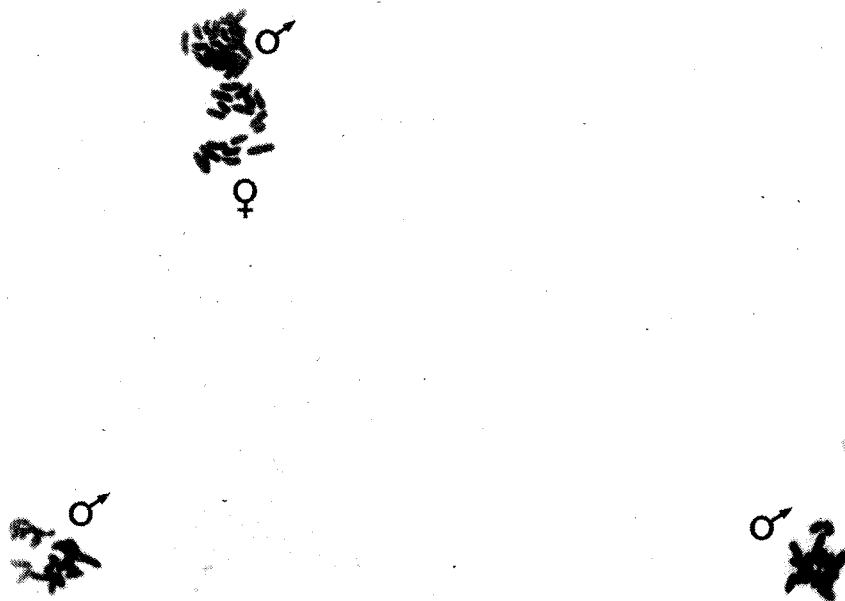


Fig. 45.- Embrió tetraploide a causa d'una trispèrmia. El grau de condensació cromosòmica diferencial impedeix confondre'l amb un originat per la no-extrusió del segon corpuscle polar acompanyat d'una dispèrmia. D'altra banda no hi ha cap possibilitat que siguin dos embrions, ja que els altres que es van fixar simultàniament es van observar i eren normals.

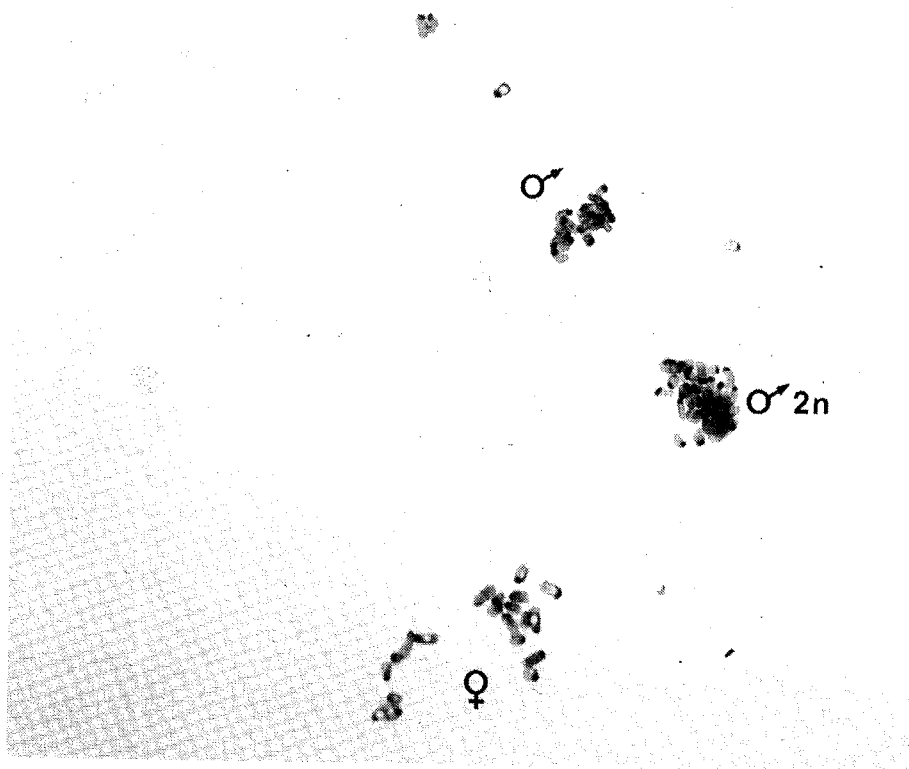


Fig. 46.- Embrió tetraploide originat per una dispèrnia en la qual ha intervingut un espermatozoide diploide. Malgrat que en un dels complements masculí no es pugui comptar el nombre exacte de cromosomes, el recompte de centròmers permet assegurar que aquest nombre ha d'excedir molt els vint cromosomes, la qual cosa fa pensar que sigui diploide.

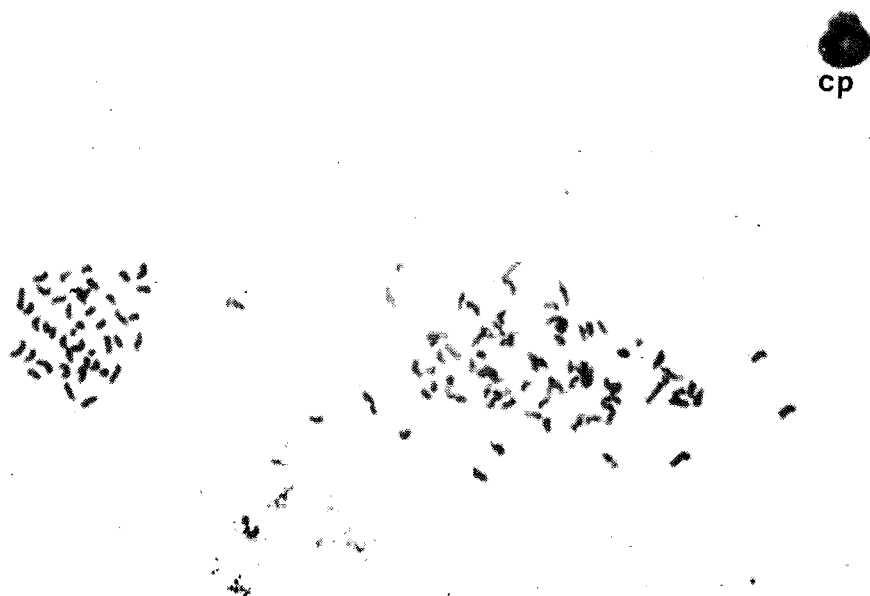


Fig. 47.- Embrió pentaploide d'origen incert, ja que el nombre tan elevat de cromosomes no ha afavorit la seva extensió. De tota manera sembla observar-s'hi dos complements diferenciats, l'origen dels quals és difícil d'esbrinar. A destacar també la presència d'un corpuscle polar (cp) a la vora de l'embrió.

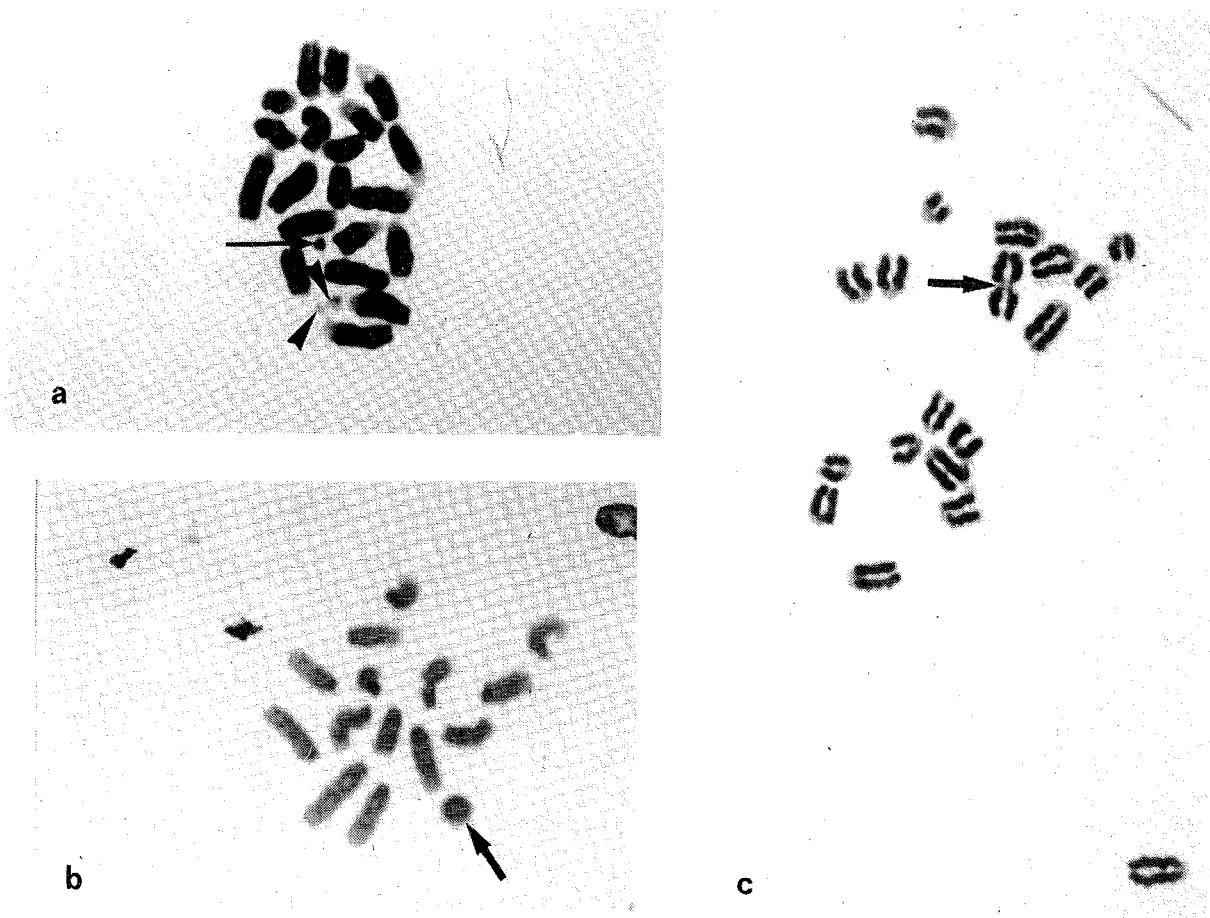


Fig. 48.- Anomalies estructurals trobades amb més freqüència en la mostra.

- a- Complement amb tres fragments acèntrics. La fletxa assenyala un fragment eucromàtic, mentre que els caps de fletxa n'assenyalen dos d'heterocromatina.
- b- Complement hipoploide (amb 15 cromosomes) i un cromosoma en anell (fletxa).
- c- Complement amb 19 cromosomes, un dels quals, metacèntric (fletxa), és el producte d'una fusió cèntrica entre dos cromosomes acrocèntrics.



Fig. 49.- Embrió en el qual no es distingeixen els complements d'origen patern i matern perquè s'ha produït la singàmia i els cromosomes d'ambdós resten barrejats, formant un conjunt de quaranta cromosomes.



Fig. 50.- Embrió fecundat no analitzable perquè, mentre que en el complement femení s'hi distingeixen clarament els vint cromosomes, el masculí, menys condensat, resta encara en profase.

La major asincronia de la fecundació in vitro respecte la in vitro afavoria l'aparició d'aquest tipus d'embrions, així com també afavoria la d'embrions en els que s'hagués produït la singàmia.

. Els embrions morien en fases anteriors a la condensació cromosòmica, després de l'acabament de la meiosi femenina, de manera que apareixen en forma de pro-nuclis interfàsics descondensats (el masculí més gran que el femení) (fig. 51) i dels quals només es podien detectar polispermies en cas d'observar més de dos pro-nuclis (fig. 52). Malgrat això no han estat inclosos en l'anàlisi estadística a causa del risc d'error que comporta una identificació d'aquest tipus.

. Hi ha casos en què es donava una activació partenogenètica de l'òocit per acció de la incubació. Aleshores s'observava només un complement cromosòmic i un corpuscle polar (fig. 53). A vegades era difícil de distingir de la fuga d'un complement provocada per la pròpia fixació i, per tant, tampoc no han estat inclosos en l'anàlisi estadística.

. Un altre cas en què els embrions obtinguts no eren analitzables eren aquells en els quals la qualitat de l'extensió no permetia una anàlisi acurada de llurs característiques cromosòmiques (fig. 54).

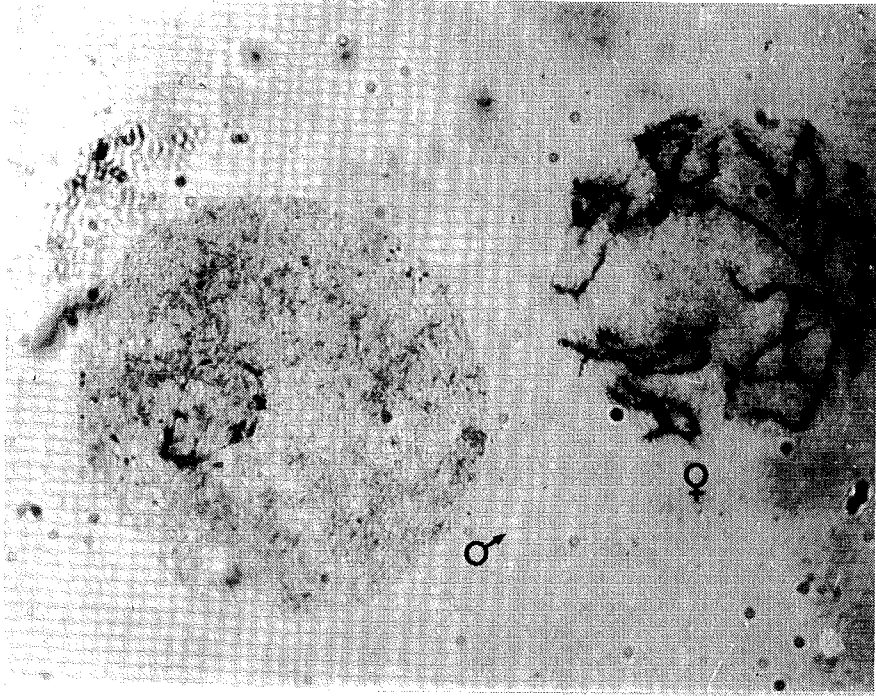


Fig. 51.- Pro-nuclis masculí i femení abans de la condensació de la cromatina en forma de cromosomes.